



UN/M
POSGRADO 

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO EN CÁNCER DE LAS
VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
BIOL. SAMANTHA CARRERA CÁCERES

TUTOR: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi mamá gracias por tu cariño y comprensión, recuerda que me diste el mejor regalo que sólo tú me pudiste haber dado: la vida. Te quiero mucho.

A mi papá gracias por estar a mi lado, por ayudarme a poner las cosas en perspectiva, por tu apoyo incondicional. Gracias por los momentos juntos, te quiero mucho.

A mis hermanos, Jaime te quiero mucho (que no se te olvide). A Hamish y Faride, mis chiquitos, gracias por recordarme lo que es el amor puro y sincero, los quiero mucho.

A mi familia, gracias por su apoyo y cariño.

A Daniela, Lorna, Nadia y Yess gracias por su amistad, por seguir conmigo después de tantos años, por escucharme y apoyarme cuando lo necesito. Gracias por enseñarme que a la verdadera amistad no le importa la distancia.

A Dalia, Adriana, Gaby y José Luis muchas gracias por su amistad, por permitirme aprender algo valioso de cada uno de ustedes. Gracias por su apoyo, sus comentarios y ayudarme a esclarecer las dudas que surgieron en cada una de las etapas de mi proyecto. Por las largas pláticas, siempre constructivas, las risas y la buena compañía.

A Miriam por enseñarme todas las técnicas que necesitaba para elaborar este proyecto y por tu asesoría, sin eso, todo esto no hubiera sido posible. Muchas gracias por tu apoyo.

A todos los del laboratorio gracias por hacer tan amena y divertida mi estancia en este laboratorio y por todo lo demás.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por permitirme estar en su laboratorio y aprender varias cosas de usted. También en el tiempo que estuve en su laboratorio aprendí lo que significa estar en un laboratorio de investigación. Muchas gracias por todo.

Al jurado: Dr. Marco A. Cerbón, Dra. Marcela Lizano, Dra. Leticia Rocha, Dr. Luis Padilla y Dr. Luis Covarrubias, muchas gracias por sus valiosas observaciones y comentarios que permitieron darle una mejor forma a esta tesis.

Y por último, gracias a todos los demás que estuvieron conmigo en esta etapa de mi vida, fue un grato placer.

Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alenjandro García Carrancá en el laboratorio de Virus y Cáncer, de la Unidad de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología y del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

Se agradece la colaboración en la obtención de las muestras y la recolección de los datos de los pacientes que estuvo a cargo de la Dra. Dulce Ma. Hernández del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI (IMSS) y de su equipo, Teresa Apresa y el Dr. Gallegos.

Índice

Abreviaturas.....	7
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas.....	9
Resumen	10
1. Introducción.....	12
1.1 Cáncer de las Vías Aerodigestivas Superiores	12
1.1.1 Factores de riesgo	13
1.2 Los Virus del Papiloma Humano.....	17
1.2.1 Genes y ciclo de vida del virus	18
1.2.2 Clasificación del Virus del Papiloma humano	20
1.2.3 Variantes de VPH 16	20
1.3 Cáncer de las Vías Aerodigestivas Superiores y VPH	22
1.3.1 Infección por VPH en Vías Aerodigestivas Superiores.....	23
1.3.2 VPH en estudios de casos y controles	24
1.3.3 Utilidad de detección de VPH en muestras de cáncer de VADS	26
1.3.4 Estudios en población mexicana.....	28
1.4 Justificación.....	28
1.5 Hipótesis	30
1.6 Objetivos.....	30
1.6.1 Objetivo General.....	30
1.6.2 Objetivos Específicos	30
2. Metodología.....	31
2.1 Extracción de ADN	31
2.2 Amplificación y Secuenciación	32
2.2.1 Amplificación del gen L1	33
2.2.2 Amplificación de E6 y LCR de VPH 16	35
2.3 Análisis de los datos	36
3. Resultados.....	37
3.1 Características demográficas y factores de riesgo	39
3.2 Prevalencia de VPH.....	40
3.2.1 Tipos de VPH	42

3.2.2 Prevalencia de VPH asociada a factores de riesgo	43
3.2.3 Variantes de VPH 16	44
4. Discusión	46
5. Conclusiones.....	51
Referencias	52

Abreviaturas

μl	microlitros
AA	Asiático Americana
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Af1	Africana 1
Af2	Africana 2
ARN	Ácido ribonucleico
As	Asiática
CaCU	Cáncer cervicouterino
E	Europea
E6BP	Proteína de unión a E6
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ENA	Encuestas Nacionales de Adicciones
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
hDlg	Human discs large tumor suppressor protein
IARC	International Agency for Research in Cancer
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LCR	Región larga de control
NA1	Norteamericana 1
ORFs	Marcos de lectura abiertos
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SCJs	Uniones escamo columnares
Tm	Temperatura de alineamiento
VADS	Vías aerodigestivas superiores
VPH	Virus del papiloma humano

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de casos de cáncer de VADS por sitio anatómico.....	13
Figura 2. Prevalencia de tabaquismo en adultos (20 años o más).	15
Figura 3. Consumo de alcohol per capita al año en la población mexicana de 1961- 2001..	16
Figura 4. Mapa del genoma de VPH 16.	17
Figura 5. Modelo general del ciclo de vida del VPH.	18
Figura 6. Distribución de variantes de VPH 16 en CaCU.	21
Figura 7. Clasificación de los carcinomas estudiados por sitio anatómico.	37
Figura 8. La mayoría de las muestras analizadas contenían ADN adecuado para realizar las reacciones de PCR.....	39
Figura 9. Amplificación de las muestras de casos y controles con MY09/MY11 y GP5+/GP6+..	41
Figura 10. Prevalencia de VPH por sitio anatómico.	42
Figura 11. Amplificación del gen E6 de las muestras positivas a VPH 16..	44
Figura 12. Variantes de VPH 16 en casos y controles.....	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y la secuenciación.....	32
Tabla 2. Condiciones específicas de magnesio y Tm para los oligonucleótidos utilizados	33
Tabla 3. Condiciones de ciclado y temperatura para la reacción de secuenciación	35
Tabla 4. Cambios en la secuencia del genoma de VPH 16 utilizados para determinar las variantes.....	35
Tabla 5. Distribución de muestras analizadas según sitio anatómico.....	38
Tabla 6. Descripción de la población de estudio y factores de riesgo para cáncer de VADS	40
Tabla 7. Prevalencia de VPH en casos y controles.....	40
Tabla 8. Distribución de tipos de VPH en casos y controles.....	43
Tabla 9. Riesgo de cáncer de VADS asociado con presencia de ADN de VPH por consumo de tabaco y alcohol.....	43
Tabla 10. Distribución de variantes de VPH 16 determinadas por PCR con oligonucleótidos específicos para E6 de este tipo viral y secuenciación en muestras de casos y controles.....	45

Resumen

El cáncer de las vías aerodigestivas superiores (VADS) es el sexto más prevalente a nivel mundial. El consumo de tabaco y alcohol son los principales factores de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer sin embargo, se ha sugerido que algunos casos pueden estar asociados con infecciones de VPH. Esta asociación se ve reforzada por el hecho de que los tipos de VPH de alto riesgo para cáncer cervicouterino (CaCU) son también los detectados con mayor frecuencia en cáncer de VADS. La prevalencia de VPH en este sitio anatómico no se conoce con exactitud, ya que los porcentajes de detección varían entre 0 y 100% dependiendo del estudio y de los métodos utilizados. A pesar de que el tipo 16 es el más prevalente en este epitelio, se ha encontrado en casi un 90% de las muestras de cáncer de VADS positivas para VPH, poco se ha evaluado la presencia de variantes.

En poblaciones mexicanas no se han realizado estudios concluyentes para determinar la prevalencia de VPH en cáncer de VADS. En este estudio se determinó la prevalencia de VPH en muestras de biopsias y células exfoliadas de pacientes con cáncer de VADS, así como en células exfoliadas de personas sanas. Además se establecieron los tipos y variantes de VPH 16 presentes en la población mexicana con cáncer de VADS y sin él.

Se analizaron 65 muestras de pacientes con cáncer de VADS que consistían en biopsias y células exfoliadas, y 78 muestras de células exfoliadas de la cavidad oral de controles. Para determinar la presencia del virus se extrajo el ADN de las muestras y se les realizó una PCR con oligonucleótidos que amplifican la región L1 del ADN viral y a las muestras negativas se les realizó una PCR anidada con dos juegos de oligonucleótidos para la misma región. Posteriormente, y para determinar los tipos presentes en esta población, se secuenciaron los fragmentos obtenidos y se compararon en BLAST. Una vez que se determinaron los tipos, se tomó ADN de las muestras positivas para el tipo 16 y se les realizó otra PCR con oligonucleótidos específicos para este tipo viral con el fin de determinar las variantes presentes. Una vez amplificado el fragmento, se secuenció para posteriormente buscar los cambios reportados en la secuencia y poder determinar las variantes.

Se encontró una prevalencia del 64.6% en las muestras de pacientes con cáncer de VADS y 56.4% en las muestras de controles. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Se encontraron 4 tipos diferentes de VPH en las muestras analizadas (13, 16, 18 y 31) siendo el tipo 16 el más frecuente tanto en casos (90.3%) como en controles (81.4%). En cuanto a las variantes de VPH 16, la variante Europea (E) fue la más prevalente en ambos grupos y no se encontraron diferencias significativas entre casos y controles. Además se evaluó la relación entre VPH y los dos factores de riesgo más importantes para el desarrollo de cáncer de VADS, tabaco y alcohol. Se encontró una diferencia marginal entre casos y controles para la presencia de VPH y tabaquismo, y las razones de momios indican que en los pacientes que tenían ambos factores hay un riesgo mayor para cáncer de VADS.

Se pudo establecer la prevalencia de VPH en los pacientes con cáncer y controles en una muestra de población mexicana, sin embargo no se encontraron diferencias que pudieran indicar un papel del VPH como posible factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de VADS. Se estableció que el tipo más prevalente en este sitio anatómico es el 16 y que la variante que está presente con mayor frecuencia es la Europea tanto en casos como en controles. Se observó una relación entre la presencia de VPH y el consumo de tabaco que refiere a un sinergismo entre ambos factores y cáncer de VADS. Se necesitan hacer otros estudios que permitan evaluar el efecto que pudiera tener la presencia de VPH en la mucosa de las VADS.

1. Introducción

1.1 Cáncer de las Vías Aerodigestivas Superiores

El Cáncer de las vías aerodigestivas superiores (VADS), también conocido como cáncer de cabeza y cuello, es el sexto cáncer más prevalente a nivel mundial. El término cáncer de las vías aerodigestivas superiores se usa para denotar cáncer de la cavidad oral, faringe (nasofaringe, orofaringe, e hipofaringe), laringe y esófago (Syrjanen, 2004). De todos los casos, más del 90% son carcinomas de células escamosas, y dos terceras partes de éstos se presentan en hombres. En el 2002 mundialmente se presentaron aproximadamente 640,000 nuevos casos y la mortalidad fue de 350,000. El país con la más alta prevalencia es India y la incidencia en otros lugares como Europa del Este ha ido aumentando en los últimos años. Las neoplasias malignas de las VADS representan el 12% de las lesiones malignas de cabeza y cuello, con 2269 casos en México al año (Tirado, Granados, 2007). Los sitios específicos se distribuyen tal como se muestra en la figura 1, en donde el sitio con la mayor incidencia es la laringe. Con relación a la mortalidad, las cifras absolutas son relativamente bajas, con 623 casos al año (Anaya-Saavedra *et al.*, 2008). Sin embargo, si tomamos en cuenta la letalidad (probabilidad de morir una vez diagnosticada la enfermedad) encontramos que ésta es muy alta entre los afectados llegando a ser de cerca del 100% para los casos de orofaringe, 94% de laringe y 83% de hipofaringe (Tirado, Granados, 2007). Además es importante mencionar las graves secuelas estéticas y funcionales derivadas del tratamiento.

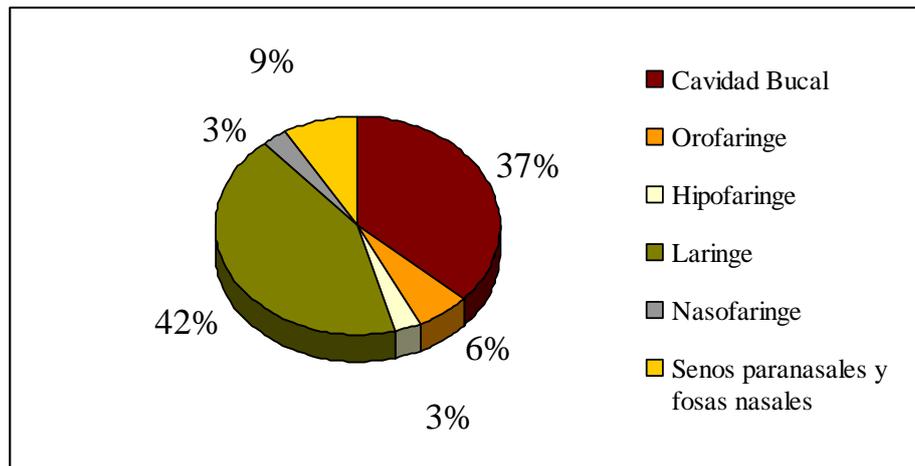


Figura 1. Distribución de casos de cáncer de VADS por sitio anatómico. En México en el 2002 el mayor número de casos de cáncer de VADS se registraron en la laringe con 974 casos, seguido por la cavidad bucal con 833. (Tirado, Granados, 2007)

Hay dos tipos de lesiones premalignas que al parecer dan lugar al cáncer en esta región, la leucoplaquia y la eritroplaquia, aunque hay algunos cánceres orales que no tienen etapas premalignas. La leucoplaquia es un aumento de grosor en la mucosa con apariencia blanca, se ha observado que este tipo de lesión muy pocas veces progresa a un carcinoma invasor de células escamosas, debido al bajo grado de displasia que posee. Por otro lado, la eritroplaquia es una manifestación clínica común del carcinoma de células escamosas y se caracteriza por que la mucosa es delgada y compuesta por células indiferenciadas, similares a las de la capa basal sin queratinización. Este tipo de características morfológicas son las reconocidas en los carcinomas in situ de cuello uterino. A pesar de que existen lesiones precursoras que podrían indicar que existe un riesgo de una progresión a cáncer, la mayoría de los cánceres de este sitio no son detectados a tiempo ya que un alto porcentaje de las lesiones son asintomáticas (Crissman *et al.*, 1993).

1.1.1 Factores de riesgo

Los cánceres de VADS representan un grupo morfológicamente diverso de lesiones, lo cual puede reflejar diferencias potenciales en etiologías y factores de riesgo para diferentes sitios (Watts *et al.*, 1991). Los principales factores de riesgo para este tipo de cáncer son el consumo de tabaco y en segundo lugar el consumo de alcohol, los cuales

pueden explicar el 75-85% de los casos (Gillison *et al.*, 2000; Herrero, 2003; Herrero *et al.*, 2003; Syrjanen, 2005). El riesgo es mayor en personas que tienen altos niveles de consumo de alcohol y tabaco, y aumenta aún más (11 veces) en personas que combinan ambas conductas (Schwartz *et al.*, 1998). En algunos lugares del mundo donde hay un alto consumo de estos productos este tipo de cáncer tiene una mayor incidencia.

En nuestro país, se han registrado variaciones en la frecuencia de tabaquismo en los últimos años, teniendo un aumento significativo en mujeres pero una disminución en la población en general. La cantidad de hombres que fuman es tres veces mayor a la cantidad de mujeres fumadoras, independientemente de la edad (Figura 2). Los datos sobre el consumo de tabaco que se obtuvieron en las Encuestas Nacionales de Adicciones (ENA) durante el periodo de 1988 a 1998 demuestran un ligero incremento en la prevalencia de fumadores, de 25.8% a 27.7%, pero en la encuesta de 2002 se muestra que hubo una disminución a 23.5%. Si observamos datos más recientes, como los presentados la Encuesta Nacional de Salud (ENSA, 2003) y la encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006), en los adultos con 20 años o más se observa también un aumento en el número de fumadores diarios de 12.9% en 2000 a 13.3% en 2006. En el caso de los fumadores ocasionales, hay una disminución significativa en los porcentajes con 9.4% en el año 2000 y 5.6% en el 2006 (Villalobos, Rojas, 2007). En cuanto al género, existe un incremento en el número de mujeres fumadoras, la proporción aumentó de 8.4% a 10.7% en el grupo de edad de 20 a 29 años, la misma tendencia se observa en los demás grupos de edad. Algunos datos estadísticos proporcionados por la organización panamericana de salud (OPS) indican que el consumo de cigarrillos per capita en nuestro país ha disminuido en los últimos 30 años (PATIOS, 2004).

En cuanto a los adolescentes, la prevalencia de tabaquismo entre 10 y 19 años de edad fue de 9.7% en el año 2000 y de 7.6% en 2006. Los resultados de ENSANUT 2006 muestran diferencias en la prevalencia entre hombres y mujeres conforme aumenta la edad. En los hombres el porcentaje de fumadores aumenta cinco veces entre el grupo de edad de 13 a 15 años y el de 16 a 19 años (4.6% vs. 25.9%). En las mujeres también se observa un aumento de casi 4 veces en el porcentaje entre esos mismos grupos de edad (2.4% vs. 9.5%).

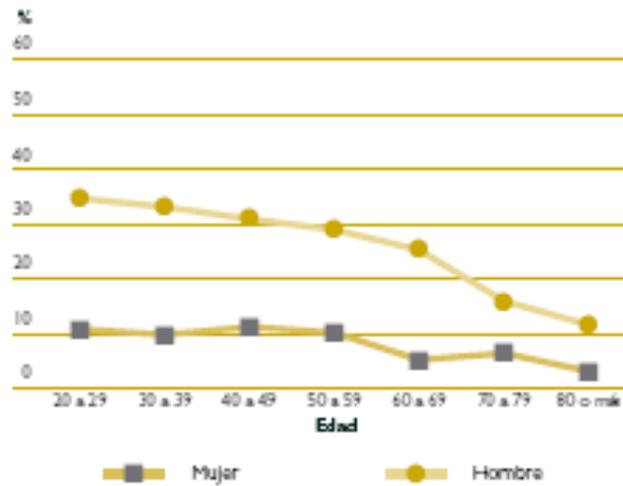
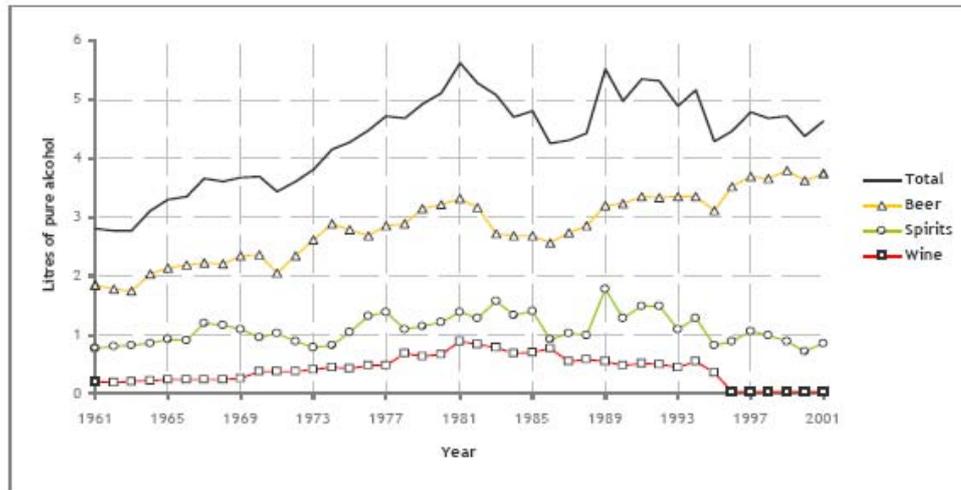


Figura 2. Prevalencia de tabaquismo en adultos (20 años o más). Distribución del porcentaje de consumo de tabaco por grupo de edad en la población mexicana. ENSANUT, 2006.

En el consumo de alcohol se observa lo mismo que con el tabaco, en los hombres es casi tres veces mayor que mujeres. En la Encuesta Nacional de Adicciones (2002) se reporta que el 64.9% de la población entre 12 y 65 años ha ingerido bebidas alcohólicas alguna vez en su vida. En el grupo de 20 a 29 años el 60% de los hombres consumen bebidas alcohólicas, por lo menos una vez al mes, mientras que únicamente el 20% de las mujeres en el mismo grupo de edad refieren dicha conducta (ENSANUT, 2006). En ambos sexos, la proporción va disminuyendo conforme el grupo de edad es mayor. En cuanto al consumo per capita en la población mayor de 15 años se han reportado variaciones importantes en los últimos 40 años, pero no se observa una tendencia a la baja o alza al menos en los últimos 20 años (Figura 3). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Global Alcohol Database el consumo per capita de alcohol en México en 2004 fue de 4.5 litros al año.

La información de consumo de alcohol en adolescentes muestra que el 17.7% de ellos ha ingerido bebidas alcohólicas. El 21% de los hombres reportaron consumo semanal de cinco o más copas de alcohol en una ocasión, mientras que en las mujeres, sólo el 10% reportaron este mismo dato (ENSANUT, 2006).



Sources: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), World Drink Trends 2003

Figura 3. Consumo de alcohol per capita al año en la población mexicana de 1961-2001. Se observan grandes variaciones en el consumo de alcohol al año en nuestro país.

A pesar de que hay una tendencia a la baja en la cantidad de fumadores en el país las tasas de mortalidad por cáncer de VADS no ha variado de manera significativa en los últimos 20 años, lo cual ha hecho pensar desde hace algún tiempo que otros factores pudieran estar involucrados (Anaya-Saavedra *et al.*, 2008). En otros países del mundo se observa lo mismo, en donde la incidencia de cáncer de cabeza y cuello se ha mantenido constante (Frisch *et al.*, 2000) o ha aumentado (Syrjanen, 2004) en los últimos años a pesar de que se ha visto una disminución en la cantidad de fumadores. Además, el 15-20% de los casos de cáncer de VADS se presentan en individuos que no consumen tabaco y/o alcohol. Debido a esto, se ha sugerido que el virus del papiloma humano podría explicar el desarrollo de algunos de estos cánceres pero esto no se ha podido establecer aún. Se sabe que este virus puede infectar estos sitios anatómicos ya que a menudo causan lesiones benignas. El virus del papiloma humano (VPH) está fuertemente asociado al desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU) y de sus lesiones precursoras. En cáncer de VADS no está establecido el papel que pudiera desarrollar este virus, a pesar de que se ha encontrado su presencia y de que el epitelio en este sitio anatómico parece ser ideal para la infección del virus.

1.2 Los Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños y desnudos, su cápside es de forma icosaédrica compuesta por 72 capsómeros. Su genoma está constituido por ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases. Solamente una de las cadenas de ADN codifica para los marcos de lectura abiertos (ORFs) y consiste en una región temprana que codifica para seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y una región tardía que codifica para dos genes (L1 y L2) (Figura 4). Además posee una región larga de control (LCR), la cual no codifica para proteínas y tiene numerosos sitios de unión para activadores y represores de la transcripción y posee el origen de replicación viral.

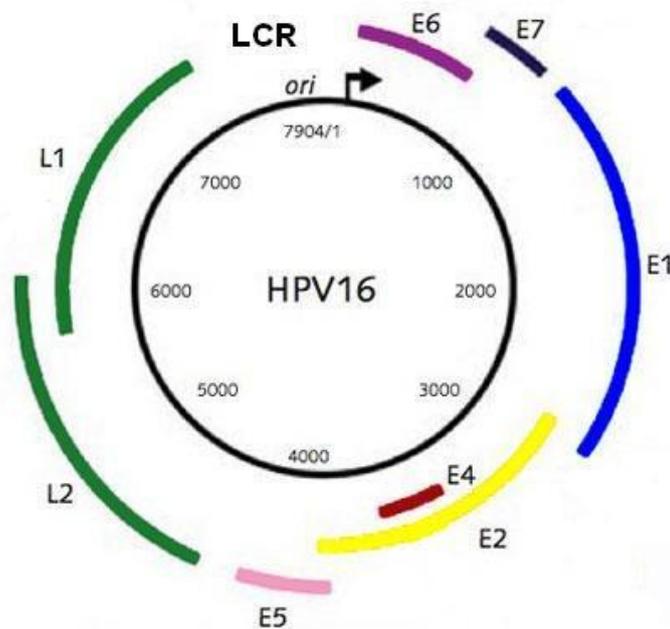


Figura 4. Mapa del genoma de VPH 16. Posee una región con genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7; una región con genes tardíos: L1 y L2; y una región larga de control (LCR).

Estos virus infectan células epiteliales, ya sea de la piel o de las mucosas (zur Hausen, 2000). La infección inicial requiere que las partículas virales tengan acceso a las células en la capa basal, en el cuello uterino esto ocurre a través de pequeñas abrasiones en el tejido (Figura 5) o durante la metaplasia escamosa en la zona de transformación cuando las células basales están expuestas (Doorbar, 2005). El ciclo de vida del virus está estrechamente relacionado con el programa de diferenciación de las células del epitelio

escamoso estratificado, con la producción de viriones restringida a las células suprabasales diferenciadas (Figura 5) (Doorbar, 2005).

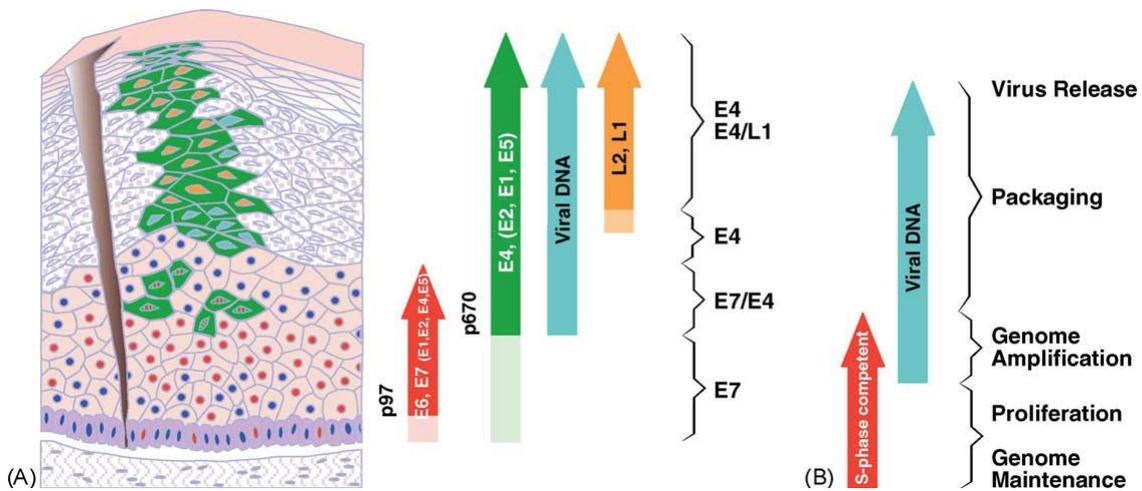


Figura 5. Modelo general del ciclo de vida del VPH. El ciclo de vida del VPH está estrechamente relacionado con la diferenciación del epitelio escamoso estratificado. (Doorbar, 2005)

1.2.1 Genes y ciclo de vida del virus

En el epitelio escamoso estratificado normal las células basales completan su ciclo celular y se detienen en la fase G₀ después de migrar a la capa suprabasal y llevan a cabo un proceso de diferenciación terminal. En las células infectadas por VPH, que expresan E7 y E6, se impide que se detenga el ciclo celular después de la mitosis y que las células tengan una diferenciación normal.

Los promotores temprano y tardío regulan la expresión de los genes de VPH durante las fases del ciclo de vida del virus. Además, la expresión de algunos de los genes tempranos está regulada, en parte, por mecanismos de splicing alternativo. Los factores de transcripción que regulan al promotor temprano se unen a sitios localizados en la LCR. La transcripción de los genes virales tardíos se activa en el epitelio en diferenciación a partir de sitios localizados en el ORF de E7.

Las proteínas codificadas por los genes E1 y E2 están entre las primeras en ser expresadas durante el ciclo de vida del virus y actúan como factores de replicación. E1 tiene actividad de helicasa que ayuda a separar las hebras de ADN para su replicación.

La proteína E2, además de tener funciones en el reconocimiento del origen de replicación, ayuda a regular la transcripción del virus, ya que tiene la habilidad para activar o reprimir la expresión de genes, lo cual contribuye a controlar el número de copias virales en las células sin diferenciar. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas, debido a que tienen actividades que estimulan la progresión celular ya que se unen a reguladores del ciclo celular. E7 se une a la familia de proteínas de pRB que tienen una función como reguladores negativos de la entrada de la célula a la fase S. La proteína E7 se une a Rb y lo secuestra, previniendo que se una a E2F y lo inactive. E2F es un factor de transcripción necesario para la expresión de las proteínas necesarias para la síntesis de ADN; al estar activado la célula entra en fase S y se pierde la regulación del ciclo celular. E7 además se une a otras proteínas del ciclo celular como desacetilasas de histonas, AP-1 y a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p21 y p27. La proteína E6 complementa la actividad de E7 y funciona para prevenir la inducción de apoptosis en respuesta a la inducción de la fase S por parte de E7. E6 se une a la proteína supresora de tumor p53 y la marca para su degradación, además E6 también se puede asociar a otras proteínas pro-apoptóticas incluyendo Bak y Bax. Esto predispone a la célula a la acumulación de mutaciones que da como resultado la transformación. De esta manera E6 y E7 provocan inestabilidad genómica, permiten la replicación del virus, la inmortalización de las células y su transformación (Doorbar, 2005).

E4 es sintetizada principalmente en las fases tardías del ciclo de vida del virus, en los virus de alto riesgo puede estar involucrada en la regulación de la expresión génica ya que interactúa con una helicasa de ARN. El gen E5 se expresa durante las infecciones productivas, pero se ha observado que en CaCU se pierde durante la integración del genoma viral al genoma de la célula. Se ha sugerido que E5 se une al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), pero su función no ha sido establecida de manera clara (Doorbar, 2005).

Las proteínas estructurales se expresan en las capas superiores del epitelio, una vez que se ha completado la síntesis de ADN viral. L2 es la proteína menor de la cápside, la proteína mayor (L1) se expresa después de L2 permitiendo el ensamblaje de las partículas virales. La cápside está formada por 360 copias de L1 y por 12 copias de L2 organizadas en 72 capsómeros (Figura 4) (Doorbar, 2005).

El virus del papiloma humano es causa necesaria para el desarrollo de CaCU, así como de otros tipos de cáncer en el área anogenital. Se tiene evidencia de que está presente casi en la totalidad de los casos de CaCU. El ADN viral generalmente está en forma episomal en lesiones benignas, pero se ha visto que conforme las lesiones progresan a CaCU se encuentra en una mayor proporción de forma integrada en el genoma de la célula. Se cree que éste es un evento clave en la carcinogénesis inducida por VPH. En las lesiones malignas, durante la integración el genoma de VPH comúnmente se fragmenta en la región E1/E2, lo que a veces resulta en la pérdida de los genes E1 y E2. La pérdida de E2, que tiene como una de sus actividades la inhibición de la transcripción de la región temprana, resulta en una sobre expresión de E6 y E7 lo cual conlleva a la transformación maligna de las células hospederas.

1.2.2 Clasificación del Virus del Papiloma Humano

Se han identificado más de 100 tipos diferentes de VPH basándose en las variaciones de su secuencia de ADN, los cuales difieren por más de un 10% de su secuencia. Una tercera parte de estos virus infectan mucosas. Existen algunos tipos de VPH que están relacionados más frecuentemente con el desarrollo de cáncer, a éstos se les ha clasificado como de alto riesgo (VPH 16 y 18, entre otros) y los involucrados en el desarrollo de lesiones benignas se conocen como de bajo riesgo (VPH 6 y 11, entre otros).

1.2.3 Variantes de VPH 16

Para los tipos de alto riesgo estudiados se han descrito variantes con respecto a su secuencia de ADN. Las variantes intratípicas son VPHs que varían en su secuencia de ADN por 2% o menos en regiones específicas de su genoma (Yamada *et al.*, 1997). Se ha sugerido que estas variaciones podrían afectar la capacidad oncogénica del virus. Las variantes más estudiadas debido a su prevalencia son las del tipo 16. Se han identificado seis grupos de variantes del tipo 16 incluyendo la secuencia prototipo, también llamada

Europea (E), y se les ha relacionado con áreas geográficas distintas: Asiático-americanas (AA), Norteamericanas 1 (NA1), Asiáticas (As), Africanas 1 (Af1) y Africanas 2 (Af2). Las variantes naturales de VPH 16 se han encontrado en los genes E6, E2, L1 y L2 y también en la LCR (Yamada *et al.*, 1997).

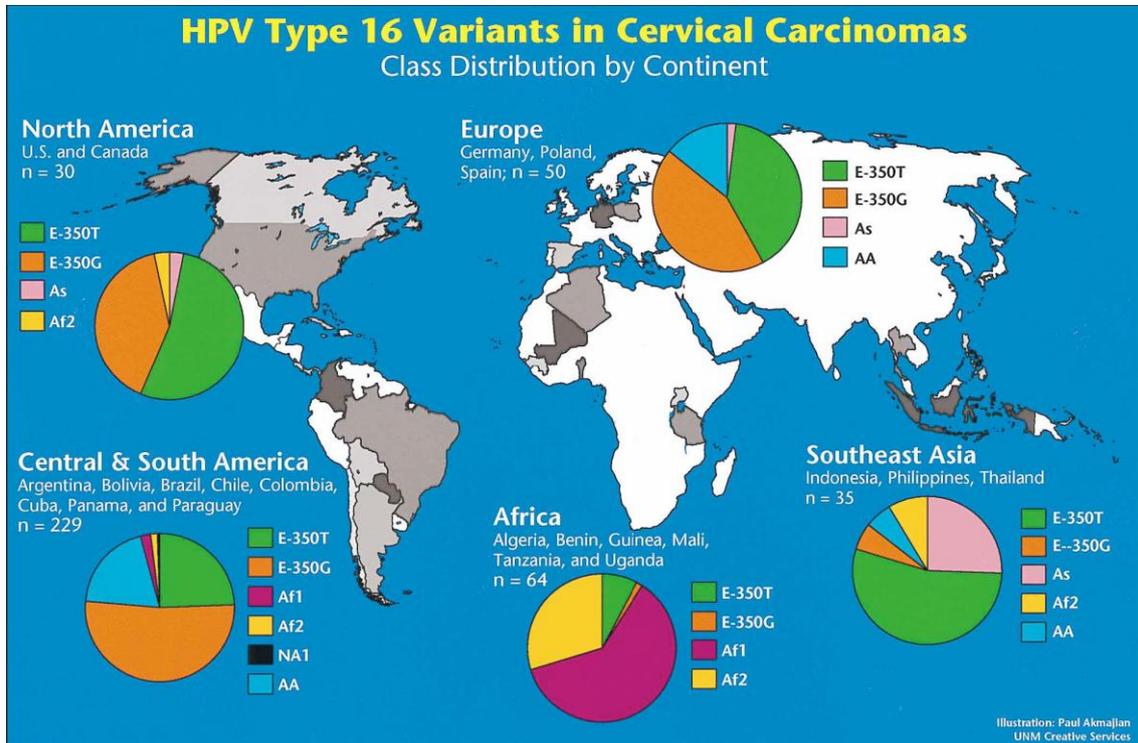


Figura 6. Distribución de variantes de VPH 16 en CaCU. Las variantes del tipo 16 se distribuyen de manera diferente según las regiones del mundo. Aún así en la mayoría de los continentes la variante encontrada con mayor frecuencia es la Europea, con excepción de África en donde la variante Africana 1 es la más abundante. En la figura se muestra la distribución de las variantes: E-350T (Europea prototipo), E-350G (Europea con un cambio en la posición 350 por G), Af1 (Africana 1), Af2 (Africana 2), NA1 (Norteamericana 1), AA (Asiático Americana) y As (Asiática) (Yamada *et al.*, 1997).

Algunos estudios sugieren que las variantes del tipo 16 tienen diferencias en cuanto a su oncogenicidad. Los cambios en la LCR pueden tener implicaciones en la regulación de la expresión de los diferentes genes de VPH, pero sobretodo en la expresión de los oncogenes E6 y E7. Se ha observado que los cambios en la secuencia de la LCR de las diferentes variantes pueden ocasionar alteraciones en las actividades del promotor temprano, en algunas variantes como AA y NA1 la actividad de este promotor se ve aumentada (Kammer *et al.*, 2000; Veress *et al.*, 1999).

Las variaciones en la secuencia del gen E6 pueden tener implicaciones importantes para la actividad de esta proteína. La infección con las variantes Af1, As y AA de E6 confiere un riesgo mayor a desarrollar cáncer cervicouterino y a la progresión de sus lesiones precursoras (Xi *et al.*, 1997; Zehbe *et al.*, 1998). En un estudio realizado por Berumen *et al.* (2001) se observó una asociación entre la presencia de la variante AA en la población mexicana y el desarrollo de carcinoma de cuello uterino en mujeres más jóvenes. También observaron que ésta era la única variante que estaba presente en los adenocarcinomas positivos para el tipo 16, y que además confería un mayor riesgo en el desarrollo de CaCU. Todo esto sugiere que la variante AA tiene una mayor capacidad oncogénica que la variante E (Berumen *et al.*, 2001).

La diferencia en la capacidad oncogénica de las variantes de E6 se debe a que los cambios ocurren en posiciones cruciales para la actividad de la proteína, lo cual afecta sus propiedades bioquímicas. En un estudio realizado por Stoppler *et al.* (1996) se encontró que algunas variantes de E6 diferían en su capacidad de alterar la diferenciación de queratinocitos *in vitro* y de degradar p53 *in vitro* con respecto al prototipo. Diferencias en la habilidad de E6 para marcar a p53 para su degradación, degradar a Bax y en la capacidad para unirse a proteínas como E6BP y hDIg también han sido descritas (Lichtig *et al.*, 2006).

1.3 Cáncer de las Vías Aerodigestivas Superiores y VPH

Como se mencionó anteriormente, los principales factores de riesgo para este tipo de cáncer son el consumo de tabaco y de alcohol (Gillison *et al.*, 2000; Herrero, 2003; Herrero *et al.*, 2003; Syrjanen, 2005). Sin embargo, una proporción (15-20%) de casos de cáncer de VADS ocurren en personas que no consumen tabaco ni alcohol. La conexión entre VPH y cáncer oral se propuso porque se observaron los efectos citopáticos, células atípicas con presencia de un halo perinuclear (coilocitos), de la infección por VPH en la mucosa oral. Por esto, algunos reportes sugieren que el virus del papiloma humano puede ser un factor importante en el desarrollo de este tipo de cáncer (Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). La presencia de epitelio estratificado y las uniones escamo-columnares (SCJs) en múltiples sitios del

tracto respiratorio, similares a las de cuello uterino, parecen ser apropiados para la infección viral en esta región (Syrjanen, 2005).

1.3.1 Infección por VPH en Vías Aerodigestivas Superiores

La mayor parte de la laringe está cubierta por epitelio respiratorio (pseudoestratificado, ciliado y columnar), sin embargo, las cuerdas vocales y la superficie lingual de la epiglotis están cubiertas por epitelio escamoso estratificado creando sitios ideales para la infección en este sitio (Syrjanen, 2005). Se tiene evidencia que la infección por VPH en esta región es posible, los tipos 6 y 11 de VPH han sido asociados con papilomatosis laringea, una proliferación de células escamosas benignas de la laringe la cual afecta las cuerdas vocales, tanto en niños como en adultos. También estos tipos están involucrados en la formación de papilomas orales, condiloma acuminatum, verruga vulgaris e hiperplasia. Además, los tipos 13 y 32 han sido identificados específicamente en hiperplasia epitelial focal oral (Watts *et al.*, 1991).

Estudios epidemiológicos sugieren que ciertos comportamientos sexuales como un alto número de parejas sexuales, edad temprana de primera relación sexual, entre otros, son un factor de riesgo para el desarrollo de ciertos tipos de Cáncer de VADS (D'Souza *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 1998). A pesar de esto, y de que el VPH es un importante agente de transmisión sexual, no se ha podido establecer de manera clara la relación que hay entre la presencia del virus y el desarrollo de cáncer debido a las variaciones en los porcentajes de detección dependiendo del estudio (0-100%). Estas variaciones se pueden deber a diferencias en los tipos de muestras analizadas, sensibilidad de los métodos utilizados y los sitios anatómicos de las muestras evaluadas, entre otros.

También hay una gran variación en los porcentajes de detección en la mucosa oral normal (0-70%), lo cual se cree que es debido a los métodos utilizados y a las poblaciones estudiadas. Se ha evaluado la presencia de ADN de VPH en la cavidad oral de niños y adolescentes menores de 20 años, y fue encontrada en un 6% de 268 muestras analizadas. El grupo de edad con una mayor prevalencia fueron los niños menores de 7 años en donde se encontró en 8.7%. El 50 % de los VPH encontrados fueron de alto riesgo (Summersgill *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Terai *et al.*

(1999) evaluaron la presencia de VPH en la mucosa oral de 37 adultos (media de edad 32 años) sin ninguna lesión. Usando oligonucleótidos consenso para la región de L1 encontraron VPH en 81.1% de las muestras estudiadas. La presencia de VPH en la mucosa oral normal sugeriría que no todas las infecciones por VPH llevan necesariamente a la transformación maligna. En cuanto a las lesiones premalignas orales también se ha encontrado la presencia del virus en un porcentaje muy variable de las muestras (0-85%) (Ha, Califano, 2004).

1.3.2 VPH en estudios de casos y controles

Algunos estudios de casos y controles han encontrado discrepancias en cuanto a la prevalencia de VPH en células exfoliadas de la cavidad oral. Hay algunos estudios en donde no se encontró una asociación entre la presencia de VPH en tejido de células exfoliadas y el riesgo de padecer cáncer oral. En un estudio realizado por Schwartz et al (1998) encontraron que no había diferencia entre la prevalencia de VPH en muestras de células exfoliadas de casos y controles (9.3% vs. 9.2%) detectado por PCR. En ese mismo estudio encontraron que la asociación entre el riesgo de padecer cáncer de VADS y el consumo de tabaco y alcohol era muy fuerte, sugiriendo que el impacto de cualquier otro factor es muy pequeño y que el papel del VPH en la carcinogénesis oral podría ser en combinación con estos factores. Otros estudios de casos y controles se han hecho con un gran número de muestras incluyendo pacientes de diferentes regiones del mundo, como el estudio multicéntrico realizado por la IARC (International Agency for Research in Cancer) en donde encontraron VPH en 4.7% de los pacientes con cáncer de la cavidad oral, 8.9% de los pacientes con cáncer de orofaringe y 6.9% de los controles, en muestras de células exfoliadas (Herrero *et al.*, 2003). A pesar de la baja frecuencia con que fue encontrado el virus, los autores no descartan la posibilidad de que esté involucrado en el desarrollo de un pequeño grupo de estos cánceres. Hay otros estudios en donde la prevalencia en células exfoliadas de casos y controles es muy diferente entre si. En un estudio realizado en EUA encontraron que la prevalencia de VPH en células exfoliadas de pacientes con cáncer de VADS fue del doble que el encontrado en células exfoliadas de controles (22.9% vs 10.8%) (Smith *et al.*, 2004). Se concluyó que los individuos que tenían VPH en las células exfoliadas de la mucosa oral tenían un riesgo mayor de padecer cáncer de VADS.

Se ha observado que los tipos de VPH de alto riesgo más frecuentes implicados en el cáncer cervicouterino también son los que están presentes con mayor frecuencia en el cáncer de las vías aerodigestivas superiores, VPH 16 y 18 principalmente. El tipo 16 ha sido identificado en un porcentaje muy variable (20-90%) de los carcinomas orales-faríngeos (Syrjanen, 2005). En un estudio realizado por Gillison et al. (2000) en 253 pacientes diagnosticados con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se encontró VPH en 25% de las muestras, VPH 16 fue encontrado en el 90% de éstos. Dada la alta frecuencia del tipo 16 en este mismo estudio se determinaron las variantes presentes en los casos estudiados y se observó una distribución de frecuencias de variantes similar a la reportada en CaCU para esa región (EUA) en donde la variante Europea fue encontrada en el 75% de los casos.

Se ha observado una mayor prevalencia de VPH en la orofaringe, específicamente en las amígdalas, y en la laringe que en otros sitios, por lo que pareciera que el VPH tiene predilección por infectar ciertos sitios. Esto se puede deber a que las amígdalas están localizadas en el límite entre los órganos exteriores e interiores y pueden tener procesos metaplásicos. También debido a sus crestas invaginadas, las amígdalas tienen una superficie epitelial extensa, lo cual puede facilitar el acceso del virus a las células basales. En algunos estudios la prevalencia de VPH en la orofaringe es muy alta, como en el estudio de Gillison et al. (2000) en donde la prevalencia en este sitio fue de 57% comparada con la laringe que fue el segundo sitio con mayor prevalencia con 19%. Algunos estudios muestran que en los sitios anatómicos que conforman la orofaringe la infección por VPH es más frecuente en la amígdala. En un estudio realizado por Klusmann et al. (2001) el ADN de VPH fue encontrado con mayor frecuencia en la orofaringe (45%), especialmente en los tumores de amígdala (58%). En contraste, en otros sitios anatómicos los porcentajes de detección fueron bajos, variando entre el 7 y 25%. En un estudio realizado por Smith et al. (2004), el porcentaje de detección de ADN de VPH en la orofaringe fue de 38% comparado con un 15% en la cavidad oral.

Otro de los factores que puede hacer que varíen los porcentajes de detección es la carga viral. En el estudio realizado por Klusmann et al. (2001) se evaluó la carga viral en siete muestras de tumores de amígdala positivos para VPH 16. Encontraron que la carga viral variaba entre 6.6×10^{-4} a 172 copias del virus por cada copia del gen de β -globina

detectado por medio de PCR cuantitativo en tiempo real. En este estudio no se evaluaron muestras de otros sitios anatómicos, pero en otros estudios se ha observado que la carga viral varía en relación con los sitios anatómicos en donde se presenta el tumor. En un estudio realizado por Kosiken et al (2003) se evaluó la carga viral en 25 tumores de pacientes con cáncer de cabeza y cuello positivos para VPH 16 por PCR en tiempo real. Los autores observaron que la carga viral variaba de 1 copia a 4 millones de copias del gen E6 por cada 10,000 células. La diferencia entre sitios fue notable ya que los carcinomas de amígdala tenían mucha mayor carga viral (80,000 veces más) comparada con los demás sitios.

1.3.3 Utilidad de detección de VPH en muestras de cáncer de VADS

Algunos estudios sugieren que la presencia de VPH es un buen marcador pronóstico para los pacientes con cáncer de VADS. En un estudio realizado por Mellin *et al.* (2000) se evaluó el riesgo de recaída y la supervivencia de pacientes con carcinoma de amígdala. Encontraron que en el grupo de pacientes positivos para el virus el 53% no había recaído después de tres años en comparación con el 21% de los pacientes del grupo negativo. La disminución en el riesgo de recaída para los pacientes VPH positivos fue independiente de edad y sexo. En cuanto al tiempo de supervivencia encontraron que, a tres años, el 65.3% de los pacientes VPH positivos habían sobrevivido en contraste con los VPH negativos de los cuales sólo 31.5% sobrevivieron. La supervivencia de los pacientes positivos a VPH fue independiente del estadio de la enfermedad, edad o género. Algo similar se observó en un estudio realizado por Gillison et al. (2000) en donde los pacientes con tumores VPH positivos tuvieron un 40% menos riesgo de muerte comparado con los VPH negativos.

Se ha tratado de ver si existe una relación entre la presencia de anticuerpos con proteínas de VPH y el estatus del virus en el tumor y si esto confiere un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de VADS. Para estudiar si los marcadores de exposición pasada a VPH son útiles para identificar a los pacientes cuyos tumores están relacionados con el virus, algunos investigadores han comparado la prevalencia de anticuerpos contra las proteínas de la cápside o contra E6 y E7 en casos y en controles.

La presencia de anticuerpos específicos contra E6/E7 es un marcador de invasión y de eventos tardíos en el proceso de enfermedad. En el artículo realizado por Schwartz et al. (1998) encontraron una mayor frecuencia de anticuerpos contra las proteínas de la cápside de VPH 16 en casos que en controles, aproximadamente la mitad del grupo de casos tuvo respuesta mientras que sólo una tercera parte de los controles la tuvieron. El 70% de los pacientes cuyos tumores tenían ADN de VPH tipo 16 también tuvieron respuestas de anticuerpos contra estas proteínas. A pesar de esto los autores no descartan la posibilidad de que esta respuesta sea por una infección posterior a la formación del tumor o al tratamiento del paciente o que sea resultado de una infección en otros sitios anatómicos diferentes a la cavidad oral. En otro estudio se evaluó la presencia de anticuerpos contra E6 y E7 de VPH 16 y 18 en el suero de 144 pacientes con carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y 288 controles pareados por edad y sexo (Zumbach *et al.*, 2000). Encontraron anticuerpos contra estas proteínas en 12% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, mientras que sólo el 3.5% de los controles evaluados los presentaron. De los pacientes cuyos tumores tenían ADN de VPH sólo el 37% tuvo anticuerpos contra E6 y/o E7. En un estudio realizado por Smith et al. (2007) evaluaron la presencia de anticuerpos contra las proteínas de la cápside y contra E6 y E7 del tipo 16 en 204 muestras de casos de cáncer de VADS y 326 controles (personas sanas, sin antecedentes de cáncer). Los anticuerpos contra E6 fueron encontrados con mayor frecuencia en los pacientes con cáncer que en controles (20.6% vs. 0.9%), lo mismo sucedió con los anticuerpos contra E7 (18.6% vs. 0.6%). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas al evaluar anticuerpos contra las proteínas de la cápside. También evaluaron la presencia de ADN viral en los tumores de los pacientes y encontraron que 74% de los pacientes que tuvieron tumores positivos para VPH también presentaron anticuerpos con E6 y/o E7, mientras que únicamente encontraron estos anticuerpos en 5% de los pacientes con tumores negativos a VPH. Esto sugiere una buena correlación entre los marcadores serológicos y el estatus de VPH en el tumor. Fueron muy pocas las muestras de controles que fueron seropositivos para anticuerpos contra E6 y E7 por lo que cuando evaluaron el riesgo de cáncer de VADS, éste fue muy alto en los pacientes positivos para estos anticuerpos. Cuando ajustaron estos riesgos para tabaco, los autores observaron un riesgo mayor entre los fumadores positivos para anticuerpos contra E6 y E7, aunque la diferencia no fue significativa ($p=0.06$). Sin embargo, encontraron una diferencia significativa entre los fumadores y los no fumadores en cuanto a la seropositividad contra las proteínas de la

cápside, representando que la presencia de anticuerpos contra L1 sumada al consumo de tabaco confería un mayor riesgo ($p=0.02$) (Smith *et al.*, 2007).

1.3.4 Estudios en población mexicana

En México se han realizado pocos estudios que evalúan la prevalencia de VPH en cáncer de VADS. Uno de los más importantes es el realizado por Ibieta *et al.* (2005) en donde se analizaron 50 biopsias de pacientes con cáncer de la cavidad oral provenientes del Departamento de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología. Analizaron la prevalencia mediante el uso de PCR y encontraron que el VPH estuvo presente en 43% de las muestras analizadas. También relacionaron los factores de riesgo con la presencia de VPH y no encontraron diferencias en el consumo de alcohol o tabaco entre los pacientes positivos y negativos para la presencia del virus. Dada la prevalencia encontrada los autores sugieren que el virus puede estar involucrado en el desarrollo de un grupo de casos de este tipo de cáncer (Ibieta *et al.*, 2005).

1.4 Justificación

Se conoce poco acerca de la historia natural de VPH en el epitelio de las vías aerodigestivas superiores, por lo que es necesario investigar el papel que representan estos virus, tanto en epitelio normal como en cáncer. Hay gran evidencia de la asociación de VPH y cáncer cervicouterino, por lo que mecanismos similares podrían estar involucrados en la carcinogénesis oral.

Se ha investigado en cuello uterino las variantes de VPH 16 y se piensa que puede haber diferencias en sus propiedades biológicas y en su contribución al desarrollo de cáncer. Dado que este tipo es el más frecuente encontrado en muestras de cáncer de las vías aerodigestivas superiores, faltaría ver si la distribución de variantes es semejante a la encontrada en CaCU, lo cual reflejaría la importancia de este tipo viral en el desarrollo de cáncer.

En nuestro país se han realizado pocos estudios sobre este tema y es importante conocer en que medida se le puede atribuir a este virus el desarrollo de este tipo de cáncer en México, así como los tipos y variantes que están presentes en la población.

1.5 Hipótesis

La prevalencia del virus del papiloma humano en la mucosa de las vías aerodigestivas superiores de pacientes con cáncer es mayor que la prevalencia en personas sanas.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Conocer la prevalencia de virus del papiloma humano, los tipos y las variantes del tipo 16 en cáncer de las vías aerodigestivas superiores y en muestras de personas sanas.

1.6.2 Objetivos Específicos

- 1) Identificar la presencia de VPH en muestras de células exfoliadas y biopsias de pacientes con cáncer de vías aerodigestivas superiores y de células exfoliadas de la cavidad oral de controles por amplificación por PCR.
- 2) Conocer los tipos de VPH presentes en muestras de cáncer y en controles por secuenciación de los productos de PCR.
- 3) Determinar las variantes de VPH 16 que están relacionadas con el cáncer de las vías aerodigestivas superiores.
- 4) Observar si existe asociación entre la presencia de VPH y las variantes del tipo 16 con sitio anatómico, consumo de tabaco y alcohol.

2. Metodología

Se obtuvieron muestras de células exfoliadas y biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinomas epidermoides de las vías aerodigestivas superiores provenientes del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los pacientes no habían recibido ningún tratamiento previo a la toma de la muestra.

Las muestras controles se obtuvieron también de células exfoliadas de pacientes del hospital de especialidades del Centro Medico Siglo XXI y de personas que acudieron a la Unidad de Medicina Familiar No. 1 del IMSS por diversos padecimientos. Los controles eran personas sanas, sin ningún antecedente de cáncer.

2.1 Extracción de ADN

Se tomaron 500 μ l de las muestras de células exfoliadas colocadas anteriormente en medio de transporte (DIGENE). Se agregaron 50 μ l de proteinasa K (20mg/ml) y se incubaron a 55° C por 2 horas. Las biopsias se cortaron en pedazos pequeños y se agregaron 100 μ l de proteinasa K, se incubaron a 55° C toda la noche.

Se extrajo el ADN por el método de Salting Out (Miller *et al.*, 1988) con algunas variaciones. Se agregaron 130 μ l de NaCl 5M a cada una de las muestras y se mezclaron. Posteriormente, para precipitar el ADN, se agregaron 2 volúmenes de Etanol 100% y se mezclaron los tubos por inversión hasta observar la formación de una hebra. Se centrifugaron los tubos y al precipitado obtenido se le hicieron cuatro lavados con Etanol al 70% y finalmente se resuspendió en agua estéril. El ADN obtenido se cuantificó con un biofotómetro (EPPENDORF).

2.2 Amplificación y Secuenciación

Para corroborar que el ADN obtenido fuera de calidad y estuviera en cantidad suficiente para la amplificación por PCR, se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen β -globina. Los oligonucleótidos utilizados fueron GH20 y PC04 (GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') que amplifican un fragmento de 268 pb (Resnick *et al.*, 1990). Las condiciones de PCR fueron las siguientes, en 25 μ l: dNTPs 0.2mM, MgCl₂ 4mM, GH20 1pmol, PC04 1pmol, Taq Promega 1U. Se realizaron 40 ciclos de amplificación en un termociclador Master Cycle Gradient (EPPENDORF), cada ciclo incluía 30 seg de desnaturalización a 94° C, alineamiento a 55° C por 30 seg y elongación por 45 seg a 72° C. El primer ciclo fue precedido por una desnaturalización de 5 min a 94° C y después del último ciclo se realizó un periodo de elongación de 7 min a 72° C. 5 μ l de cada uno de los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa al 1.5%, para comprobar los resultados. Todas las muestras negativas para esta reacción se excluyeron de los ensayos posteriores.

Tabla 1. Localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y la secuenciación.

Nombre	Localización del fragmento amplificado	Región del genoma que amplifican	Secuencia (5'-3') ^a	Tipo
MY09	6583-7034	L1	CGTCCMARRGGAWACTGATC	Varios
MY11 ^b			GCMCAGGGWCATAAYAATGC	
GP5+	6624-6746	L1	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	Varios
GP6 ^c			GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	
FO48	48-532	E6	GAACCGAAACCGGTTAGTAT	16
R551			GGGTTTCTCTACGTGTTCTT	
F046	46-590	E6	TTGAACCGAAACCGGTTAGT	16
R590			TCATGCAATGTAGGTGTATCTCC	
F204	204-419	E6	GCAACAGTTACTGCGACGTG	16
R419			GGACACAGTGGCTTTTGACA	
LCR7450F	7747-7810	LCR	TCAACCGAATTCGGTTGCAT	16
LCR813R			ACCTTTACACAGTTCATGTA	

^a Código de oligonucleótidos degenerados: M= A+C, R= A+G, W= A+T, Y=C+T

^b (Manos *et al.*, 1989)

^c (de Roda Husman *et al.*, 1995)

Para determinar la presencia del virus y los tipos y variantes presentes en las muestras de casos y controles se utilizó la amplificación de una región del gen L1 por medio de reacciones de PCR y posteriormente los productos de PCR amplificados de secuenciaron para determinar los tipos virales presentes. Para todas las reacciones de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos consistían en ADN extraído de las líneas celulares de cáncer cervicouterino con VPH 16, SiHa y CasKi. Los controles negativos consistieron en agua estéril sin ADN de ningún tipo.

Las condiciones generales para la amplificación por PCR fueron las siguientes en 25µl: dNTPs 0.2mM, MgCl₂ dependiendo del oligonucleótido (Tabla 2), Forward 1pmol, Reverse 1pmol, Taq Promega 1U. Se realizaron 40 ciclos de amplificación, cada ciclo incluía 30 seg de desnaturalización a 94° C, la temperatura de alineamiento (T_m) dependiendo del oligonucleótido (Tabla 2) por 30 seg y elongación por 45 seg a 72° C. El primer ciclo fue precedido por una desnaturalización de 5 min a 94° C y después del último ciclo se realizó un periodo de elongación de 7 min a 72° C. 5µl de cada uno de los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa al 1.5%, para comprobar los resultados.

Tabla 2. Condiciones específicas de magnesio y T_m para los oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Longitud Fragmento	T _m	Concentración de Mg
MY09/MY11	450 pb	55°C	4mM
GP5+/GP6+	150 pb	48°C	3mM
F048/R551	513 pb	50°C	2.5mM
F046/R590	550 pb	55°C	2mM
F204/R419	220 pb	55°C	2mM
LCR7450F/LCR813R	363 pb	58°C	2mM

2.2.1 Amplificación del gen L1

La presencia del virus se determinó por medio de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos consenso MY09/MY11 y GP5+/GP6+ (Tabla 1) que amplifican una región del gen L1 de varios tipos diferentes de VPH. (de Roda Husman *et al.*, 1995; Manos *et al.*, 1989).

A las muestras negativas para las reacciones con MY09/MY11 y GP5+/GP6+ se les realizó una PCR anidada con ambos juegos de oligonucleótidos. Primero se realizó un PCR con los oligonucleótidos MY09/MY11, con las condiciones antes mencionadas, y posteriormente se precipitó el producto de PCR con 10% de Acetato de amonio 7.8M y etanol 100%. En el mismo tubo de reacción se pusieron los reactivos para los oligonucleótidos GP5+/GP6+ y se realizó la PCR anidada, los resultados se corroboraron en un gel de Agarosa 1.5%.

El producto de PCR de las muestras positivas para MY09/MY11, GP5+/GP6+ y el anidado se limpió con el *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN). Posteriormente se realizó la secuenciación automática en el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE Biosystems). Se utilizó el *BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* para la reacción de secuencia. Para la reacción de secuencia se utilizaron 5.5µl del producto de PCR purificado, 1.5µl de *Big Dye terminator V.3*, 2µl de Buffer 5x y 1µl del oligonucleótido (1.6pmol) y se realiza una reacción de PCR con las condiciones de ciclado especificadas en la tabla 3. Una vez terminada la amplificación se procedió a purificar los productos con una precipitación con etanol. A cada muestra se le agregaron 3µl de 3M NaOAc pH 4.6, 62.5µl de non-denatured 95% etanol y 14.5µl de agua estéril, se mezclaron los tubos y se les dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron por 20 minutos, se quitó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar por 5 minutos. Finalmente se quitó el etanol y se dejó secar la pastilla, la cual se resuspendió en 20µl de *Formamida HiDi*. Antes de meter las muestras al secuenciador se desnaturalizaron por 2 minutos a 96° C y se pusieron en hielo y se cargaron en la placa de secuencia. Para determinar el tipo de VPH las secuencias se compararon con las bases de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) por medio del programa BLAST. (Altschul *et al.*, 1997)

2.3 Análisis de los datos

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SPSS v10.0 para Windows. Los datos de los pacientes se recolectaron en tablas, en donde para cada paciente se especificó género, edad, sitio anatómico del cáncer, consumo de tabaco y alcohol. Después del análisis experimental se completaron los datos de presencia o ausencia de VPH. Para saber si había diferencia con respecto las variables se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrada (χ^2) y exacta de Fish, las cuales se utilizan para evaluar si dos variables cualitativas están asociadas. Se definió un valor de $\alpha= 0.05$.

3. Resultados

Con el objeto de establecer la prevalencia de los virus del papiloma humano en una muestra de pacientes mexicanos con cáncer de las vías aerodigestivas superiores se analizaron las muestras de 69 pacientes, de las cuales 14 eran biopsias y 55 eran raspados de células exfoliadas. Todos los pacientes provenían del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI del IMSS. Las muestras de casos se clasificaron según el sitio anatómico del cual provenían en tres grupos: Cavidad Oral, Laringe y Orofaringe (Figura 7). Las muestras de cavidad oral incluyeron muestras de carcinomas de lengua, encía, carrillo, paladar duro, labio, piso de la boca, y cavidad oral. Las muestras de laringe únicamente provenían de carcinomas de laringe. Las muestras de Orofaringe incluyeron muestras de carcinoma de amígdala y de orofaringe (Tabla 5).

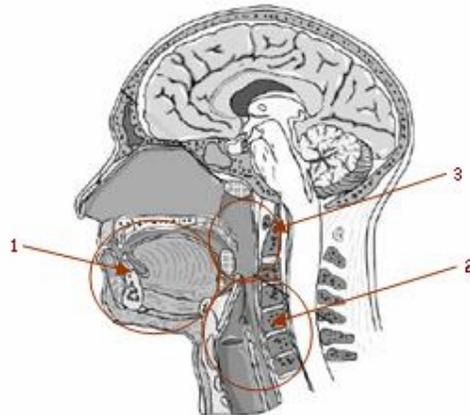


Figura 7. Clasificación de los carcinomas estudiados por sitio anatómico. 1. Cavidad Oral, 2. Laringe, 3. Orofaringe. (Modificado de (Syrjanen, 2004))

Tabla 5. Distribución de muestras analizadas según sitio anatómico.

Sitio Anatómico	Diagnóstico Clínico	No. de muestras analizadas
Cavidad Oral		
	Ca Lengua	14
	Ca Encía	6
	Ca Carrillo	4
	Ca paladar duro	2
	Ca de Labio	5
	Ca de Piso de boca	2
	Ca Cavidad Oral	3
Laringe		
	Ca de Laringe	27
Orofaringe		
	Ca Amígdala	2
	Ca Orofaringe	4

En total se analizaron 36 muestras de la cavidad oral, 27 de laringe y 6 de orofaringe (Tabla 5). Se les extrajo el ADN y posteriormente, para corroborar su calidad y si se tenía la cantidad suficiente para su amplificación por PCR, se usaron oligonucleótidos para el gen β -globina (Figura 8). De las muestras provenientes de la cavidad oral 3 fueron negativas para este ensayo, lo mismo sucedió con una muestra de laringe. En total, 4 muestras fueron negativas para la amplificación con oligonucleótidos para el gen β -globina por lo que se consideró que no se tenía material adecuado y se excluyeron de los demás análisis.

Para poder evaluar la frecuencia con la que se encuentran los VPH en la cavidad oral de la población mexicana sana, se analizaron 79 muestras de células exfoliadas de la cavidad oral de controles. Con estas muestras se siguió el mismo procedimiento que con las muestras de pacientes con cáncer para la extracción de ADN y también se corroboró la utilidad del material obtenido mediante la amplificación del gen β -globina. Solamente una muestra fue negativa para este procedimiento por lo que se excluyó de todos los demás ensayos.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

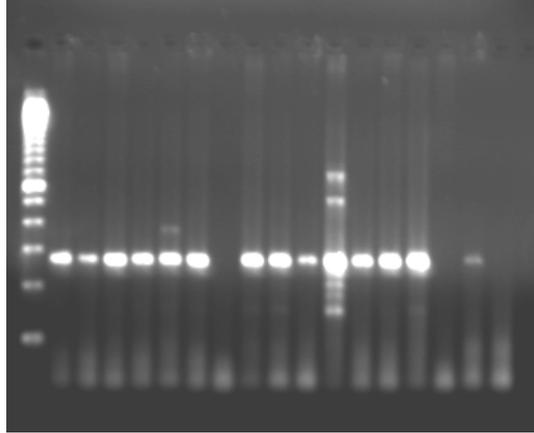


Figura 8. La mayoría de las muestras analizadas contenían ADN adecuado para realizar las reacciones de PCR. Se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el gen de β - globina para corroborar la presencia de ADN en cantidad y calidad suficiente para la amplificación por PCR. En la figura se muestra, como ejemplo, la foto de un gel de Agarosa 1.5% con los productos amplificados de 280 pb de un grupo de las muestras estudiadas. En los carriles 1 al 15 se muestra la amplificación de las muestras de casos de cáncer de VADS. En los carriles 16 y 17 se muestran el control positivo (SiHa) y negativo, respectivamente. El marcador de peso molecular de 100 pb se muestra con la letra M.

El 94.2% (65/69) de las muestras de casos y el 98.7% (78/79) de las muestras de controles fueron positivas para la amplificación del gen β -globina por PCR. Por lo tanto, se incluyeron en este trabajo 65 muestras de pacientes con cáncer de VADS y 78 muestras de controles con ADN adecuado.

3.1 Características demográficas y factores de riesgo

Se analizaron las diferencias en las características demográficas y los factores de riesgo entre los grupos de casos y controles. El promedio de edad de los pacientes fue de 63 años y de los controles fue de 64 años. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a edad ($p=0.59$). En la tabla 6 se muestra la descripción de la población de estudio y su distribución en relación a los factores de riesgo evaluados (tabaco y alcohol). En cuanto al consumo de tabaco, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de casos y controles ($p=0.06$). Lo mismo sucedió con el consumo de alcohol ($p=1.00$).

Tabla 6. Descripción de la población de estudio y factores de riesgo para cáncer de VADS

Característica	Casos (n=65)		Controles (n=78)		p
	n	(%)	n	%	
GÉNERO					
Masculino	43	(66)	46	(59)	
Femenino	22	(34)	32	(41)	0.37
EDAD					
≤50	8	(12)	12	(15)	
>51	57	(88)	66	(85)	0.59
TABACO					
Si	51	(78)	50	(64)	
No	14	(22)	28	(36)	0.06
ALCOHOL					
Si	50	(77)	60	(77)	
No	15	(23)	18	(23)	1.00

3.2 Prevalencia de VPH

Para conocer la prevalencia de VPH en los grupos de estudio se utilizó la técnica de PCR para evaluar la presencia de ADN viral. Primero se realizó la amplificación con oligonucleótidos para una región el gen L1 que permite identificar varios tipos de VPH. Con el uso de MY09/MY11 se amplificó un fragmento de 450 pb y con GP5+/GP6+ un fragmento de 150pb (Figura 9). La presencia de VPH fue detectada en 15/65 (25%) muestras de cáncer de VADS. En controles la prevalencia encontrada con estos pares de oligonucleótidos fue de 19.2% (15/78).

Tabla 7. Prevalencia de VPH en casos y controles.

Resultado	No. de casos (%) (N=65)	No. de controles (%) (N=78)	RM (IC 95%)
VPH Positivo	42 (64.6)	44 (56.4)	1.41 (0.68-2.95)
VPH Negativo	23 (35.4)	34 (43.6)	

RM= razones de momios

IC= intervalo de confianza

Para aumentar la sensibilidad del método utilizado, a las muestras negativas para los ensayos anteriores, se les realizó PCR anidado con los mismos juegos de oligonucleótidos amplificando primero con MY09/MY11 y después de precipitar el producto obtenido se amplificó con GP5+/GP6+. Se obtuvo una prevalencia de 42/65 (64.6%) en las muestras de casos. En los controles se obtuvo una frecuencia de 44/78 (56.4%). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.23$) (Tabla 7).

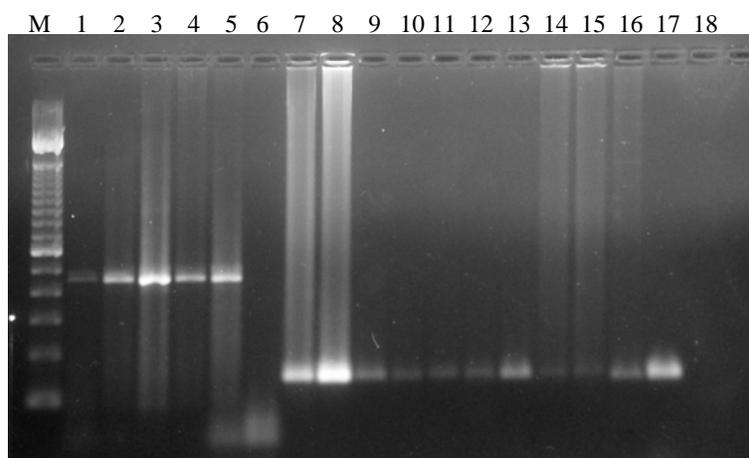


Figura 9. Amplificación de las muestras de casos y controles con MY09/MY11 y GP5+/GP6+. En los carriles 1 al 6 amplificación con los oligonucleótidos MY09/MY11, en los carriles 5 y 6 se muestran los controles positivos y negativos, respectivamente. En los carriles 7 a 18 se muestra la amplificación anidada con oligonucleótidos GP5+/GP6+, en los carriles 17 y 18 se muestran los controles positivos y negativos para esta reacción. El marcador de peso molecular de 100 kb se muestra con una M.

Debido a que algunos estudios han reportado diferencias en la prevalencia de VPH en los distintos sitios anatómicos, se analizó la prevalencia de VPH en cada uno de los sitios anatómicos por separado para ver si había diferencias. De las muestras de la cavidad oral analizadas 20/33 (60.6%) fueron positivas para VPH, mientras que 17/26 (65.4%) de las muestras de laringe y 5/6 (83.3%) de las muestras de orofaringe (Figura 10). A pesar de que la prevalencia fue mayor en las muestras de orofaringe, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios evaluados ($p=0.56$).

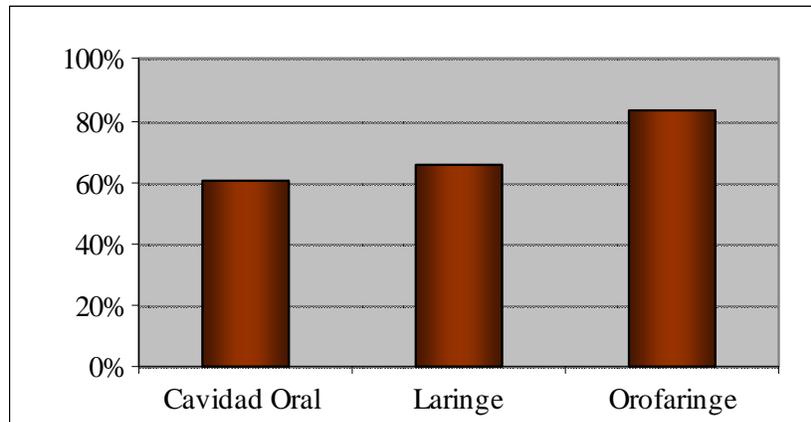


Figura 10. Prevalencia de VPH por sitio anatómico. Se observó una prevalencia mayor en la orofaringe que en los otros sitios, pero no hubo diferencias significativas.

3.2.1 Tipos de VPH

Con el fin de conocer cuáles eran los tipos de VPH que se encontraban presentes en las muestras de los pacientes y ver si existían diferencias con los encontrados en los controles se secuenciaron los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+ que consistían en fragmentos de 450pb y 150pb respectivamente (Tabla 2). También se secuenciaron los productos de PCR anidado que se obtuvieron de la amplificación con ambos juegos de oligonucleótidos (fragmentos de 150pb). Las secuencias de ADN obtenidas se compararon mediante un alineamiento en BLAST con las bases de datos para determinar los tipos de VPH. El tipo 16 fue el tipo detectado con mayor frecuencia tanto en casos como en controles. En las muestras de casos de cáncer de VADS se encontraron tres tipos diferentes, un tipo de bajo riesgo y dos de alto riesgo: VPH 13 estuvo presente en 2 muestras (6.5%), VPH 31 en 1 muestra (3.2%) y VPH 16 en 28 muestras (90.3%) (Tabla 8). En las muestras de controles se encontraron también tres tipos de VPH: el tipo 13 estuvo presente en 4 muestras (9.3%), el tipo 18 en 3 muestras (6.9%) y el tipo 16 en 35 muestras (81.4%), además se encontró una muestra con infección múltiple con los tipos 16 y 13 (2.4%) (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de tipos de VPH en casos y controles

	Casos (%)	Controles (%)
VPH 16	28 (90.3)	35 (81.4)
VPH 18	0	3 (6.9)
VPH 31	1 (3.2)	0
VPH 13	2 (6.5)	4 (9.3)
Múltiple	0	1 (2.4)
	31	43

De las 42 muestras de casos positivas para VPH, once muestras no pudieron ser tipificadas por que la cantidad de producto de PCR amplificado no fue suficiente para poder secuenciarlas. Lo mismo sucedió con una muestra de controles.

3.2.2 Prevalencia de VPH asociada a factores de riesgo

Debido a que tabaco y alcohol son los dos factores de riesgo más importantes para el desarrollo de cáncer de VADS, se analizó si había alguna diferencia en el consumo de estas dos sustancias entre los dos grupos y su relación con la presencia de VPH. El análisis de los efectos de la interacción entre VPH y la exposición a tabaco y alcohol se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Riesgo de cáncer de VADS asociado con presencia de ADN de VPH por consumo de tabaco y alcohol

Estatus de VPH	Factor de Riesgo	Casos (%)	Controles (%)	RM (IC 95%)	<i>p</i>
Tabaco					
Positivo	Si	33 (78.6)	26 (59.1)	2.62 (0.92-7.68)	0.04
	No	9 (21.4)	18 (40.9)		
Negativo	Si	18 (78.3)	24 (70.5)	1.42 (0.36-6.25)	0.58
	No	5 (21.7)	10 (29.5)		
Alcohol					
Positivo	Si	31 (73.8)	34 (77.3)	0.86 (0.28-2.57)	0.75
	No	11 (26.2)	10 (22.7)		
Negativo	Si	19 (82.6)	26 (76.5)	1.38 (0.31-7.22)	0.44
	No	4 (17.4)	8 (23.5)		

Cuando se analizan por separado la presencia del virus con respecto a los factores de riesgo se observaron datos interesantes en cuanto al consumo de tabaco. Se encontraron diferencias significativas entre casos y controles con respecto al consumo de tabaco en los pacientes positivos a VPH ($p=0.04$). Aunque la diferencia fue marginal, las razones de momios en este grupo positivo a VPH también indican que existe un riesgo de padecer cáncer de VADS asociado al consumo de tabaco y la presencia del virus. No se encontraron diferencias en el grupo negativo a VPH entre los pacientes y los controles y hábito de tabaquismo. En el análisis del consumo de alcohol no se encontraron diferencias significativas ni riesgo en el estatus de VPH y este factor entre casos y controles.

3.2.3 Variantes de VPH 16

El tipo 16 es el más frecuentemente encontrado en las muestras de cáncer cervicouterino y debido a esto se le ha dado gran importancia al estudio de sus variantes intratípicas. Algunos estudios han encontrado que existen diferencias bioquímicas en las proteínas entre una variante y otra, además de encontrar diferencias geográficas en la distribución de las mismas. Ya que el tipo 16 es el encontrado con mayor frecuencia en las muestras de cáncer de VADS decidimos evaluar las variantes del tipo 16 en estas muestras.

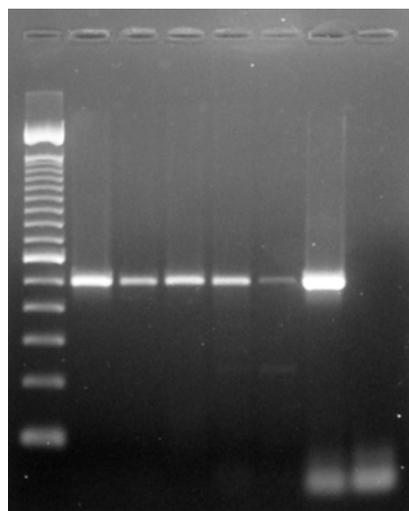


Figura 11. Amplificación del gen E6 de las muestras positivas a VPH 16. Las muestras de casos y controles positivas para el tipo 16 se amplificaron con los oligonucleótidos F048/R551, específicos para este tipo viral.

Para la determinación de variantes, las muestras de casos y controles positivas para VPH 16 se amplificaron con oligonucleótidos específicos para la región de E6 y para la LCR de este tipo viral. Se pudieron determinar las variantes presentes en 14 muestras de casos y 17 de controles, debido a la disponibilidad de ADN de las muestras.

Tabla 10. Distribución de variantes de VPH 16 determinadas por PCR con oligonucleótidos específicos para E6 de este tipo viral y secuenciación en muestras de casos y controles

	Casos, % (N=14)	Controles, % (N= 17)
Variantes		
AA	14.3	5.8
E	85.7	94.2

Solo se encontraron dos variantes en las muestras analizadas y la variante E fue la más prevalente en ambos grupos. De las muestras de pacientes con cáncer de VADS dos fueron variante Asiático americana (AA) y doce fueron Europea (E). De las 17 muestras de controles 1 fue AA y en 16 se encontró la variante E. No hubo diferencias significativas entre casos y controles ($p=0.43$) (Tabla 10).

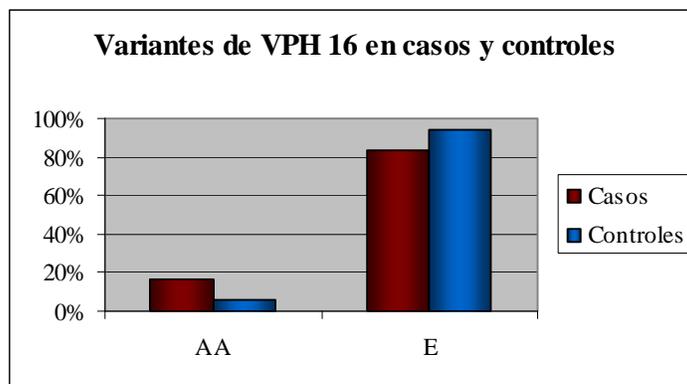


Figura 12. Variantes de VPH 16 en casos y controles. La variante europea fue la más frecuente, y no hubo diferencias entre casos y controles.

4. Discusión

Una proporción de casos de cáncer de las vías aerodigestivas superiores ocurren en personas que no fuman y que no toman (15-20%) por lo que otros factores de riesgo parecen estar involucrados (Gillison *et al.*, 2000). En nuestro país, el consumo de tabaco y alcohol *per capita* es menor en comparación con otros países, por ende, en esos lugares este tipo de cáncer afecta a una proporción mayor de la población. Además de esto, el consumo de tabaco en la población mexicana ha disminuido en los últimos años, aún así no se ha visto una disminución similar en el número de muertes relacionadas con cáncer de VADS.

A pesar de que en varios estudios se ha encontrado la presencia de VPH en cáncer de VADS, no se ha podido establecer una relación clara entre el virus y el desarrollo de tumores en este sitio. En nuestros resultados, no existen diferencias significativas entre la presencia de VPH en células exfoliadas de pacientes con cáncer de VADS y la de controles. Esto nos puede sugerir que los individuos que tienen ADN de VPH en las células exfoliadas orales no tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de las vías aerodigestivas superiores. En otros estudios también se han encontrado prevalencias que son similares entre casos y controles en células exfoliadas (Herrero *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 1998). En el estudio realizado por Herrero *et al.* (2003) se encontraron frecuencias muy parecidas en las células exfoliadas de la cavidad oral de casos y controles, con un 4.7% y 6.9% respectivamente.

Algunos trabajos únicamente evalúan la presencia del virus en biopsias de pacientes con cáncer de VADS (Gillison *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 1991), o comparan la prevalencia en biopsias de pacientes contra células exfoliadas de controles (D'Souza *et al.*, 2007). Esto no permite comparar de manera confiable la prevalencia que existe y evaluar el riesgo relacionado a la presencia de VPH en la cavidad oral y en otros sitios de las VADS. Se ha visto que no hay una correlación directa entre la presencia de VPH en células exfoliadas y biopsias de pacientes con cáncer de VADS (Herrero *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 1998). Probablemente esto se deba a las diferencias en la cantidad de células presentes en los dos tipos de muestra y de esta manera no se podría comparar bajo los mismos criterios ambos tipos de muestras. En este trabajo se evaluaron en su

mayoría muestras de células exfoliadas de los pacientes con cáncer de VADS lo que nos permite evaluar de una mejor manera las diferencias que pudieran existir entre el grupo de casos y el de controles, aún así se debería de buscar una manera de evaluar de manera confiable la prevalencia en ambos grupos, ya que no se pueden tomar biopsias de pacientes sanos.

Existe una gran variación en los porcentajes de detección entre los estudios que evalúan la presencia de VPH en cáncer de las vías aerodigestivas superiores. Estas diferencias entre estudios en cuanto a la detección se pueden deber a la frecuencia de tumores evaluados de cada uno de los sitios anatómicos, las características de los pacientes y las diferencias en la sensibilidad de los métodos utilizados. La alta prevalencia tanto en casos como en controles (64.6% y 56.4%) que observamos en este trabajo se puede deber a la sensibilidad del método utilizado. El método de PCR anidado permite una mayor sensibilidad que la utilización de una PCR convencional. Si tomamos en cuenta que en la cavidad oral y otros sitios de las VADS se ha observado que el VPH está presente en un bajo número de copias (Klussmann *et al.*, 2001; Koskinen *et al.*, 2003), la utilización de un método con mayor sensibilidad nos proporciona una manera mejor de explorar la prevalencia de VPH en este sitio anatómico. Si observamos la prevalencia obtenida en otros estudios, como la obtenida por Smith *et al.* (2004) donde únicamente utilizan la amplificación con los oligonucleótidos MY09/MY11 que es del 28.4% en muestras de casos de cáncer de VADS y 18.3% en controles y la comparamos con la obtenida en este estudio (25% y 19.2%, respectivamente) con la utilización de los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+ por separado nos daremos cuenta de que es similar.

El sitio de las VADS en donde el VPH ha sido encontrado con una mayor frecuencia es la orofaringe (Syrjanen, 2004). No se sabe exactamente por que este sitio anatómico pudiera ser más propenso a la infección por el virus, pero se cree que la infección se puede facilitar por la estructura anatómica específica de estos órganos. Las amígdalas contienen profundas invaginaciones con una superficie epitelial extensa, lo cual puede facilitar el acceso del virus a las células basales. Nuestros resultados muestran que, en efecto, la orofaringe es el sitio anatómico con una mayor prevalencia, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás sitios anatómicos. Esto se puede deber a la poca cantidad de muestras de este sitio evaluadas.

Haría falta analizar un mayor número de muestras de orofaringe para poder determinar si la prevalencia de VPH es significativamente mayor que en otros sitios.

Parece ser que en la población mexicana el VPH esta presente en un elevado número de individuos sanos, faltaría observar la prevalencia en otros grupos de edad. La alta presencia en controles nos hace pensar que el VPH pudiera estar comúnmente infectando este sitio y que mayormente la infección no represente un riesgo para el desarrollo de cáncer. Algunos trabajos han evaluado la utilidad de la presencia de anticuerpos contra VPH en sangre como predicción de los tumores de cabeza y cuello positivos para VPH (D'Souza *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2007). Esta podría representar otra aproximación para estudios posteriores que complementaran los estudios de casos y controles. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que la seropositividad es un indicativo potencial no sólo de las infecciones actuales si no también de las infecciones pasadas. Además, la presencia de anticuerpos contra VPH en sangre no está limitada a la infección en la cavidad oral, si no que es también un indicativo de infecciones en el área anogenital. Sería importante realizar un mayor número de estudios que permitieran evaluar la prevalencia real en la población mexicana en general.

El tipo más prevalente encontrado tanto en casos como en controles fue el tipo 16. En la mayoría de los estudios realizados con cáncer de las vías aerodigestivas superiores también se ha observado que el tipo 16 es por mucho el tipo más prevalente encontrado en las muestras tanto de casos como de controles. En el estudio realizado por la IARC, un estudio multicéntrico en donde participaron 9 países, el ADN de VPH 16 fue encontrado en el 94.7% de las muestras positivas a VPH de pacientes con cáncer oral evaluadas (Herrero *et al.*, 2003). Sorprendentemente, su prevalencia en este tipo de epitelio es mucho mayor que la encontrada en el área anogenital, en donde la prevalencia en CaCU es del 53.5%, en lesiones de alto grado es de 52% y de bajo grado en 49% (Clifford *et al.*, 2006).

Se encontraron cuatro tipos de VPH (13, 16, 18, 31) presentes en las muestras analizadas tanto de casos como de controles. No se encontró una amplia variedad de tipos lo cual coincide con lo encontrado en otros estudios (Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003; Klussmann *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Klussman *et al.*

(2001) en muestras de pacientes con carcinoma de amígdala se encontró VPH 16 en el 84% de las muestras analizadas, el único tipo que se encontró además de este fue el tipo 31. Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado una mayor variedad de tipos, como en el estudio realizado por Schwartz *et al.* (1998) en donde se encontraron los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35, aunque la mayoría de las muestras de casos que analizaron tenían coinfección con 16 y otros tipos de alto y bajo riesgo. En este trabajo, no se pudieron tipificar el total de las muestras positivas para VPH por falta de material por lo que no se descarta la posibilidad de que estas muestras sean de otros tipos virales.

A pesar de que el tipo 16 es el más frecuente encontrado en las muestras de cáncer de VADS, pocos estudios han investigado las variantes de VPH 16 presentes en estas muestras (Gillison *et al.*, 2000). En el estudio realizado por Gillison *et al.* (2000) se identificaron las variantes de VPH 16 por medio de amplificación por PCR en muestras de cáncer de cabeza y cuello en EUA. El 75% de las muestras tuvieron variantes Europeas, además encontraron variantes Asiáticas (17%), Norteamericanas 1 (4%) y Africanas 1 (4%). En nuestro estudio, la mayoría de las muestras positivas evaluadas fueron del tipo 16, sin embargo, no se pudieron determinar las variantes de todas ellas debido a la falta de material. Tanto en casos como en controles se encontraron dos variantes: AA y E. La variante E fue la más prevalente con un 85.7% en casos y un 94.2% en controles. No hubo diferencias significativas entre la presencia de cualquiera de estas dos variantes en casos y en controles. Se necesitaría evaluar un mayor número de muestras positivas para VPH 16 para determinar si la variante AA está presente en una mayor proporción en la población mexicana.

El VPH puede estar implicado en el desarrollo de ciertos cánceres de VADS pero no en todos dado que la mayoría (75-85%) de los casos se pueden atribuir al consumo de tabaco y alcohol, los factores etiológicos más importantes (Gillison *et al.*, 2000; Herrero, 2003; Scully, 2002; Syrjanen, 2005). Algunos investigadores sugieren que los individuos con cáncer de cabeza y cuello positivos a VPH tienen una exposición sustancialmente baja a tabaco y alcohol (Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003; Klusmann *et al.*, 2001). Nosotros limitamos el grupo de no expuestos a aquellos individuos que nunca habían consumido ninguno de los dos productos. No se encontraron evidencias de que los pacientes cuyas muestras fueron positivas para VPH tuvieran una menor exposición a tabaco y alcohol que los pacientes negativos.

En algunos trabajos se ha discutido sobre la posible asociación de VPH como cofactor con alguno de estos dos factores para el desarrollo de este tipo de cáncer (D'Souza *et al.*, 2007; Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004). Schwartz *et al.* (1998) sugieren que si el VPH 16 contribuye al cáncer oral muy probablemente lo hace a través de mecanismos que involucran a uno o a los dos factores principales de riesgo. Nosotros evaluamos las razones de momios para relación entre tabaco y alcohol y la presencia de VPH entre casos y controles. Se observó un sinergismo entre el consumo de tabaco y la presencia de VPH. A pesar de que la diferencia entre casos y controles fue marginal ($p=0.04$) las razones de momios indican un riesgo mayor para los pacientes positivos a VPH y que fuman. No se observaron diferencias entre casos y controles en el grupo negativo a VPH. En cuanto al consumo de alcohol no se encontraron diferencias entre casos y controles ni en el grupo que consumía alcohol ni en las personas que no presentaban este hábito. Sería importante analizar la relación entre la presencia del virus y el consumo de tabaco y alcohol en un mayor número de muestras de pacientes con cáncer de VADS y además observar si la presencia de anticuerpos contra el virus pudiera representar un mayor riesgo.

La detección de VPH en pacientes con cáncer de VADS podría ser importante debido a que algunos estudios sugieren diferencias en la sobrevida de los pacientes comparada con los pacientes cuyos tumores son negativos para VPH (Gillison *et al.*, 2000; Mellin *et al.*, 2000). Se atribuye esta mayor sobrevida a que estos tumores pueden tener una mayor susceptibilidad a la radio y quimioterapia (Gillison *et al.*, 2000). Sin embargo, esto también se puede deber a que en los cánceres asociados a alto consumo de tabaco y alcohol son más agresivos debido a la alta exposición durante largos periodos de tiempo a estos agentes oncogénicos. El objetivo de este estudio no comprendía la evaluación de esta variable, sin embargo parece importante el evaluar si la presencia de VPH podría ser de buen pronóstico para los pacientes con cáncer de VADS. La evaluación de VPH en las VADS también es importante debido a que si se pueden detectar ciertos casos relacionados con este virus se podrían beneficiar del desarrollo de vacunas contra el virus.

Debido a que la mayoría de las muestras analizadas fueron de células exfoliadas no se puede descartar el hecho de que la infección por el virus provenga de otro sitio diferente al del tumor o que la infección haya sido posterior al desarrollo del mismo.

La mayoría de los trabajos se han enfocado en ver si el VPH está presente, se necesitan más trabajos en donde se evalúe los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis de las vías aerodigestivas superiores y que permitan el desarrollo de biomarcadores de detección temprana de la enfermedad. Se deberían de explorar nuevas formas de identificar y caracterizar las alteraciones genéticas y los cambios en la expresión génica asociada e independiente a la infección por VPH.

5. Conclusiones

La prevalencia de ADN de VPH encontrada en los casos de pacientes con cáncer de las VADS fue similar a la encontrada en personas sanas. No se encontró una diferencia entre los grupos que pudiera sugerir un posible papel del VPH como factor de riesgo para el desarrollo de carcinomas en este sitio anatómico.

El sitio con la mayor prevalencia de VPH fue la orofaringe, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los demás sitios anatómicos.

Se analizó la relación entre los factores de riesgo más importantes para cáncer de VADS y la presencia de VPH. Se observó una diferencia marginal entre casos y controles positivos a la presencia de VPH y que además consumían tabaco. No se observaron diferencias estadísticamente significativas asociadas al consumo de alcohol y la presencia del virus entre casos y controles.

Se encontraron sólo cuatro tipos de VPH presentes en las muestras tanto de casos como de controles. El tipo encontrado con mayor frecuencia fue el 16, además se encontraron los tipos 13, 18 y 31.

Las variantes de VPH 16 encontradas fueron Europeas y Asiático Americanas. No hubo diferencias en las variantes encontradas en casos y controles.

Referencias

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho M, Zimbron-Romero A, Zepeda-Zepeda MA (2008) Oral and Pharyngeal Cancer Mortality Rates in Mexico, 1979-2003. *J Oral Pathol Med* **37**, 11-17.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, *et al.* (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1325-1330.
- Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL (2006) Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S26-34.
- Crissman JD, Visscher DW, Sakr W (1993) Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: pathologic classification. *J Cell Biochem Suppl* **17F**, 49-56.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, *et al.* (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**, 1944-1956.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, 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 (Pt 4)**, 1057-1062.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S7-15.
- ENSA (2003) Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2: La Salud de los Adultos eds. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, *et al.*). Instituto Nacional de Salud Publica, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
- ENSANUT (2006) Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2006 eds. G. O-F, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, *et al.*). Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico.
- Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ (2000) Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* **11**, 489-495.

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, *et al.* (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**, 709-720.
- Ha PK, Califano JA (2004) The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 188-196.
- Herrero R (2003) Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 47-51.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, *et al.* (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1772-1783.
- Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, *et al.* (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.
- Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H (2000) Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* **81**, 1975-1981.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, *et al.* (2001) Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**, 2875-2884.
- Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, *et al.* (2003) Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* **107**, 401-406.
- Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, *et al.* (2006) HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* **350**, 216-227.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, *et al.* (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell* **7**, 209-214.
- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* **89**, 300-304.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215.

- Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, *et al.* (1990) Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1477-1484.
- Scully C (2002) Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* **38**, 227-234.
- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, *et al.* (1998) Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1626-1636.
- Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, *et al.* (2007) Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer* **120**, 825-832.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, *et al.* (2004) Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**, 449-455.
- Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, *et al.* (1996) Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* **70**, 6987-6993.
- Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, *et al.* (2001) Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**, 62-69.
- Syrjanen S (2004) HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* **57**, 449-455.
- Syrjanen S (2005) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S59-66.
- Terai 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.
- Tirado L, Granados M (2007) Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello *Cancerologia* **2**, 9-17.
- Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H (1999) Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **80 (Pt 4)**, 1035-1043.
- Villalobos A, Rojas R (2007) Consumo de Tabaco en Mexico. Resultado de las Encuestas Nacionales de Salud 2000 y 2006. *Salud Publica de Mexico* **49**, S147-S154.

- Watts SL, Brewer EE, Fry TL (1991) Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **71**, 701-707.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, *et al.* (1997) Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**, 796-802.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, *et al.* (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* **71**, 2463-2472.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M (1998) Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* **58**, 829-833.
- Zumbach K, Hoffmann M, Kahn T, *et al.* (2000) Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* **85**, 815-818.
- zur Hausen H (2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**, 690-698.