

01484



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA  
HUMANO (VPH) EN EL CÁNCER BUCAL**

**TESIS QUE PRESENTA LA ALUMNA  
BLANCA ROSA/IBIETA ZARCO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN ODONTOLOGÍA**

**TUTOR  
DR. ALEJANDRO MOHAR BETANCOURT**

**México D.F. 2003**



A



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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA



**PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)  
EN EL CANCER BUCAL**

COMITÉ DE TESIS:

APROBADA

DR. ALEJANDRO MOHAR BETANCOURT

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SANTA PONCE BRAVO

COMITÉ TUTORIAL

DR. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ GUERRERO

COMITÉ TUTORIAL

C

## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a los profesores de estudios de posgrado e investigación de la Facultad de Odontología que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo y disposición brindada para la elaboración de este trabajo de investigación.

A mi tutor y asesores del INCan por su orientación y dirección en este proyecto de investigación.

A mis padres por su cariño y apoyo, alentándome a seguir adelante.

A Alex y Gaby por su apoyo y ayuda.      Gracias.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	3
<b>I. Introducción</b> .....	5
<b>II. Antecedentes</b> .....	7
Cáncer epidermoide de la cavidad bucal .....	7
Clasificación TNM .....	8
Factores de riesgo .....	10
Virus de Papiloma Humano (VPH) y organización genómica .....	11
Ciclo vital de los VPHs .....	15
VPHs de alto y bajo riesgo .....	16
Antecedentes de VPH .....	17
<b>III. Planteamiento del problema</b> .....	20
<b>IV. Justificación</b> .....	20
<b>V. Hipótesis</b> .....	20
<b>VI. Objetivos</b> .....	20
Objetivo general .....	20
Objetivos específico .....	21
<b>VII. Metodología</b> .....	22
Material y Métodos .....	22
Método de recolección .....	22
Técnica de Biopsia .....	23
Método de Registro y Análisis Estadístico .....	23
Universo .....	24
Muestra .....	24
Criterios de Inclusión .....	24
Criterios de Exclusión .....	24
Variables Independientes y Dependientes .....	24
Escala de Medición .....	25
Obtención y Análisis de la Información, técnica de PCR .....	25
Procedimientos del método de PCR .....	26
Digestión del tejido .....	27
Extracción de ADN .....	27
Cuantificación de ADN .....	28

Amplificación de $\beta$ -globina (PCR) .....	28
Método para detectar VPH (PCR) .....	29
Método para determinación del tipo de VPH.....	30
Método de análisis de productos amplificados (PCR) confirmados por electroforesis en el gel de agarosa.....	30
Recursos .....	31
Diseño del Estudio .....	31
<b>VIII. Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>IX. Discusión .....</b>	<b>43</b>
<b>X. Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>XI. Recomendaciones .....</b>	<b>51</b>
<b>XII. Propuestas de Investigación.....</b>	<b>51</b>
<b>XIII. Referencias .....</b>	<b>52</b>
<b>XIV. Anexos .....</b>	<b>59</b>
Anexo 1 .....	60
Anexo 2 .....	63
Anexo 3 .....	64

## Contenido de figuras

### Figura 1

Genoma del VPH 16 ..... 12

### Figura 2

Esquema de un ciclo de PCR ..... 26

### Figura 3

Caso clínico de carcinoma epidermoide de lengua móvil..... 33

### Figura 4

Cortes histológicos de carcinoma epidermoide bucal con VPH..... 33

### Figura 5

Gel de agarosa visto a través de un transiluminador de luz UV, donde se observa las bandas (+) para  $\beta$ -globina ..... 36

### Figura 6

Geles de agarosa vistos a través de un transiluminador de luz UV, donde se observan bandas (+) para VPH detectadas con primers universales por PCR ..... 37

### Figura 7

Gel de agarosa vistos a través de un transiluminador de luz UV, donde se observan bandas (+) para VPH-16 por PCR ..... 38

## Contenido de tablas

### **Tabla 1**

Sitio del tumor en los 51 pacientes con carcinoma epidermoide bucal..... 32

### **Tabla 2**

Etapa clínica TNM en los 51 pacientes con carcinoma epidermoide bucal..... 32

### **Tabla 3**

Hábito de tabaco en los 51 pacientes con carcinoma epidermoide bucal..... 34

### **Tabla 4**

Hábito de alcohol en los 51 pacientes con carcinoma epidermoide bucal..... 35

### **Tabla 5**

Combinación de hábitos de tabaco y alcohol en los 51 pacientes..... 35

### **Tabla 6**

Distribución de VPH y características clínicas con carcinoma epidermoide bucal  
en los 50 pacientes seleccionados..... 39

### **Tabla 7**

Hábitos de tabaco y alcohol en los casos VPH (+) y VPH (-)..... 40

### **Tabla 8**

Hábitos de tabaco y alcohol en ambos sexos con VPH (+) y VPH (-) ..... 41

## RESUMEN

### Prevalencia del virus de papiloma humano (VPH) en el cáncer bucal

El objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia de VPH en cáncer de cavidad bucal y determinar su asociación con los hábitos de tabaco y alcohol. Metodología.- Fue un estudio descriptivo, experimental y transversal. Se recopilaron 51 muestras de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide bucal, sin tratamiento previo que acudieron de primera vez al Departamento de Cabeza y Cuello. Un cuestionario fue aplicado para determinar la frecuencia de VPH, tabaco y alcohol en los pacientes con carcinoma epidermoide bucal. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado. Se tomó biopsia de la lesión del área más representativa y la muestra se dividió en dos partes; una se llevó a estudio histopatológico y la otra parte fue depositada en un tubo de Eppendorf y congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para su análisis por la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR), determinando la presencia de VPH y tipos. Resultados.- Se amplificó el gen de la  $\beta$ -globina en las 51 muestras, encontrando 50 positivas. De los casos analizados, el 42% fueron VPH(+) y el 58% de casos fueron VPH (-); el tipo VPH-16 se identificó en el 66.6% de los casos infectados y el 33.4% restante fueron VPHs inespecíficos. No se detectó VPH-18. De los 21 pacientes infectados con VPH, hubo 15 hombres y 6 mujeres, y los VPH(-) fueron 21 hombres y 8 mujeres. En ambos grupos la media de edad fue de 63 años, el tiempo de evolución promedio de la lesión fue de 7.8 meses y la media de Karnofsky fue del 85%. El tamaño del tumor en los casos VPH(+) fue 2 T2, 6 T3 y 13 T4 (61.9%) y los casos VPH(-) fueron 4 T1, 3 T2, 5 T3 y 17 T4 (56.7%). El tipo histológico más frecuente fue carcinoma epidermoide bien diferenciado en los casos VPH(+) con el 57.1% y el 75.9% en los casos VPH(-). El sitio del tumor en los casos VPH (+) fue en

lengua móvil con 33.4% y en los casos VPH(-) se encontró en encía inferior con el 27.6%. Presentaron mala la higiene bucal los 51 pacientes estudiados. El uso de tabaco y alcohol de los casos VPH(+) se presentó el 80.9% y el 19.1% restante no tenían ningún hábito. En los casos VPH(-) los hábitos de tabaco y alcohol se encontraron en el 79.3% y no presentaron ningún hábito el 20.7%. Conclusiones.- El porcentaje de VPH en pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal fue del 42%. Los hábitos de tabaco y alcohol fueron el 80.9% en los casos VPH(+) y el 79.3% en los casos VPH(-). El porcentaje de VPH encontrado en este estudio sugiere una probable relación entre la infección y la carcinogénesis bucal.

Palabras clave: virus de papiloma humano, cáncer oral, tabaco, alcohol, PCR.

## Summary

Prevalence of human papilloma virus (HPV) in the oral cancer.

The aim of the present study was to estimate the prevalence of the HPV in the oral cancer and to determine the association of the virus with the habits of tobacco and alcohol. Methodology.- This was a descriptive study. 51 samples of patients attending in the Department of Head and Neck for the first time were compiled. The patients presented histopathologic diagnosis of oral squamous cell carcinoma. A questionnaire was applied to determine the HPV, tobacco and alcohol frequency, and a letter of consent were signed by the patients. A biopsy was taken from the most representative area of the lesion. The sample was divided by half. One part of the sample was used for a histopathologic study, and the other part was kept in a Eppendorf tube and frozen at -70°C for further analysis by PCR method, to determine the presence of HPV and types. Results.- 51 samples were tested for the  $\beta$ -globina gen and 50 were positive. It was found that 42% of the cases were HPV (+) and 58% were HPV (-). HPV-16 was identified in 66.6%, and 33.4% were negative. HPV-18 was detected. Of the twenty one patients with HPV infection, 15 were males and 6 females. HPV(-) cases were 21 males and 8 females. In both groups mean age was 63 years, the evolution time of the tumour was from 1 to 24 months with a mean of 7.8 months, the mean of Karnofsky was 85%. The size of the tumour was 2 in T2, 6 in T3, 13 in T4 (61.9%) in the HPV(+) cases and HPV(-) cases were 4 in T1, 3 in T2, 5 in T3, 17 in T4(56.7%) The most frequent histological type was well-differentiated squamous cell carcinoma with 57.1% in HPV(+) cases and 75.9% in HPV (-) cases. The 33.4% HPV(+) cases the lesion was in tongue, and upper gum 27.6% in HPV(-) cases.

51 studies cases presented bad oral hygiene. Tobacco and alcohol habits were presented 80.9% in HPV(+) cases and 19.1% of the cases did not present that habits. In HPV(-) cases presented 79.3% tobacco and alcohol habits and 20.7% these cases didn't found that habits. Conclusions.- The percentage of HPV was 42% in patients with squamous cell carcinoma in the oral cancer. Tobacco and alcohol habits were detected in 80.9% of HPV(+) and in 79.3% of HPV(-) cases. The percentage of HPV found suggest a probable relation between infection and oral carcinogenesis.

Key words: human papilloma virus, oral cancer, tobacco, alcohol, PCR.

## I.-INTRODUCCIÓN

El cáncer es una alteración del crecimiento y diferenciación celular, con pérdida de la homeostasis tisular que provoca el surgimiento de una masa tumoral. Las células cancerosas pueden surgir de cualquier tipo de tejido, a cualquier edad e invadir tejidos vecinos por extensión directa o diseminación sistémica a través de vasos linfáticos o sanguíneos.

En los últimos años, el cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte en el mundo. El carcinoma de pulmón es el causante de más muertes por cáncer, (alrededor de 900,000 muertes por año), seguido de cáncer de estómago con más de 600,000 muertes al año y el cáncer colorectal e hígado aproximadamente de 400,000 muertes por año [1].

El cáncer de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar en la prevalencia mundial y el cáncer de la cavidad bucal es la neoplasia más frecuente del tracto aerodigestivo superior [2].

Mundialmente en el año 2000, la incidencia del cáncer varía por el sexo, edad, raza y zona geográfica. En el sexo masculino se presentaron 3,409,000 casos, los primeros lugares los ocuparon: el 22% en pulmón, el 17% en estómago, el 12% en próstata, el 9% en vejiga, el 5% en cavidad bucal y el 1% en piel; en el sexo femenino hubo 4,837,000 casos ocupando los siguientes lugares: el 26% en mama, el 15% en colon, el 14% en útero, el 2% en cavidad bucal y el 1% en piel [3].

En México en el año 1997 la incidencia, con respecto al sexo, hubo 8,984 (31.4%) hombres ocupando los siguientes lugares: el 8.3% en testículo, el 7.4% en pulmón, el 7.1% fueron linfomas no Hodgkin, el 5.5% en próstata y el 4.6% en cavidad bucal; y en

mujeres se presentaron 19,584 ( 68.6%) ocupando el 30.6% el cáncer cervico-uterino, el 20.6% en mama y el 1.3 % en cavidad bucal [4].

Según otros trabajos estadísticos en México, el cáncer representa un problema de salud pública, ya que ocupa el 2º lugar de mortalidad en el país, el cáncer de cabeza y cuello comprende el 5.2% de las neoplasias malignas de todo el organismo, un 20% de estos cánceres son de cavidad bucal y ocupa el lugar 22 en frecuencia del total de las neoplasias malignas por topografía con el 1%; en cuanto al sexo, se presenta más frecuentemente en hombres en 4.6% y sólo el 1.3% en mujeres [5,6] .

En la actualidad se considera que el cáncer es una enfermedad multifactorial donde intervienen factores demográficos, físicos, químicos, genéticos, mecanismos hormonales, inmunológicos, y agentes infecciosos como virus y bacterias. En nuestro país, en las ultimas décadas se ha incrementado el carcinoma de vías respiratorias y digestivas altas en mujeres. Ésto quizá se deba al aumento en el consumo de tabaco y alcohol [4]. A nivel mundial, se estima que un 20% de las muertes por cáncer podrían ser prevenidas eliminando el uso de tabaco [1].

## II.- ANTECEDENTES

### Cáncer de la cavidad bucal

Los neoplasias malignas de la cavidad bucal se diagnostican en etapas avanzadas en un 80%, pueden ser multicéntricas, se presentan con más frecuencia en la 4ª década de la vida (95%), seguido de la 5ª y 6ª décadas; la razón hombre: mujer es de 3:1. El tipo histológico de mayor frecuencia es el carcinoma epidermoide en un 90% y el resto son adenocarcinomas, melanomas, sarcomas y linfomas [6,7].

El carcinoma epidermoide es una neoplasia del epitelio escamoso estratificado que puede producir proliferación celular destructiva local y metástasis a distancia, donde las células malignas rompen la membrana basal y son capaces de erosionar los vasos linfáticos y sanguíneos, haciendo posible su transporte a distancia [8].

La incidencia y localización del carcinoma epidermoide en diversos sitios anatómicos de la cavidad bucal se manifiesta distintamente; algunas áreas parecen ser relativamente inmunes, mientras que otras parecen ser especialmente proclives al mismo.

De acuerdo al sitio anatómico del tumor primario, en la lengua móvil se presenta el 25%, seguido de piso de boca con el 20%, encía con el 6%, paladar duro con el 5%, el área de trígono retromolar con el 5% y mucosa bucal con el 2%. Hay alta incidencia de cáncer de labio (40%); sin embargo, éste se considera topográficamente como de piel [7,8].

La clasificación de las neoplasias malignas es fundamental para seleccionar una terapéutica adecuada y establecer los factores pronósticos. Por ello, para clasificar se toman en cuenta los siguientes indicadores: el tamaño del tumor (T), la ausencia ó

presencia de nódulos linfáticos, así como su número y tamaño (N), y la presencia o ausencia de metástasis (M) [7].

La Clasificación TNM y las etapas clínicas de estas neoplasias de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer (AJCC-1997) es la siguiente [9]:

Tumor primario (T)

Tx Tumor no valorable

T0 Tumor no evidente

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor de 2 cm o menos en su dimensión mayor

T2 Tumor de 2 a 4 cm en su dimensión mayor

T3 Tumor mayor de 4 cm en su dimensión mayor

T4 Labio: Tumor que invade estructuras adyacentes (cortical ósea, lengua, piel del cuello)

T4 Cavity bucal: Tumor que invade estructuras adyacentes (cortical ósea, partes blandas del cuello, músculos profundos (extrínsecos) de la lengua, seno maxilar y piel

Ganglios Cervicales (N)

Nx Ganglios linfáticos regionales no valorables

N0 Sin ganglios linfáticos regionales metastásicos

N1 Metástasis ganglionar linfática única ipsilateral, de 3 cm o menos en su mayor dimensión.

N2 Metástasis ganglionar linfática única ipsilateral, de 3 a 6 cm en su dimensión mayor, o existen múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno mayor de 6 cm en su máxima

dimensión, o ganglios bilaterales o contralaterales, mayores de 6 cm en su máxima dimensión

N2a Ganglio ipsilateral único mayor de 3 cm pero menor de 6 cm

N2b Múltiples ganglios ipsilaterales menores de 6 cm

N2c Ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales menores de 6 cm

N3 Metástasis a un ganglio de más de 6 cm en su dimensión mayor

N3a Ganglio ipsilateral mayor de 6 cm

N3b Ganglio bilateral mayor de 6 cm

Metástasis distantes (M)

Mx Metástasis a distancia no valorables

M0 Ausencia de metástasis a distancia

M1 Presencia de metástasis a distancia

Etapas clínicas

0 Tis N0 M0

I T1 N0 M0

II T2 N0 M0

III T3 N0 M0

T1 N1M0

T2 N1M0

T3 N1M0

IV A T4 N0 M0

T4 N1 M0

Cualquier T N2 M0

IV B Cualquier T N3 M0

IV C Cualquier N M1

El tiempo de supervivencia global aproximado para los tumores de la cavidad bucal es de 5 años.

#### Factores de Riesgo

Los estudios epidemiológicos permiten determinar los factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer bucal: entre los factores de riesgo relacionados, destacan el uso del tabaco y el consumo de alcohol, que con frecuencia se asocian en más del 95% de los casos; el consumo de la nuez de betel que se usa en los países del Sureste Asiático (India), la irritación crónica como dientes fracturados, prótesis mal adaptadas y pobre higiene bucal [10-13].

Otros agentes causales de riesgo son las infecciones virales como el virus de papiloma humano (VPH) que se encuentra en lesiones epiteliales proliferativas malignas en especial los tipos 16 y 18 hasta en un 60% y han sido considerados como posibles agentes etiológicos en carcinomas y displasias [14].

La OMS describe a las lesiones premalignas (leucoplasia, eritroplasia, liquen plano) como factores de riesgo para cáncer bucal, teniendo éstas una probabilidad de transformación a neoplasias malignas de 3 a 60% [10].

Actualmente se ha considerado al VPH como cofactor de riesgo para carcinoma epidermoide bucal, encontrando sobre todo a los VPHs de alto riesgo tipos 16 y 18, ésto tal vez se deba a la preferencia del virus por los tejidos epiteliales [15].

## El Virus de Papiloma Humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia de los papovaviridae, están considerados como virus tumorales que infectan a las células epiteliales de todas las mucosas del cuerpo humano. Zur Hausen en 1991 describió a los papilomavirus como un grupo de virus epiteliotrópicos [15]. Son virus pequeños con un diámetro aproximado de 55 nm, los cuales tienen una doble cadena circular cerrada de ADN que se encuentra asociada con histonas y encapsulado por 72 capsómeros. Algunas propiedades importantes de las partículas de los papilomavirus son: densidad de 1.34 g/mL en una solución de cloruro de cesio 33 y un coeficiente de sedimentación de S20w.

El genoma del VPH consiste de 7,200 a 8,000 pares de bases que contienen 10 regiones de lectura; la estructura del genoma viral revela semejanzas importantes entre los diferentes tipos de VPH, generalmente solo una cadena de ADN está activa en la transcripción, por lo tanto, ésta ocurre en una sola dirección y la localización del inicio de la lectura muestra un alto grado de correspondencia [15].

El genoma del VPH se divide en tres regiones que se ilustran en la Figura 1: región temprana (E), la cual codifica las proteínas virales necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular; la región tardía (L) que codifica proteínas estructurales, y la región reguladora conocida como región de largo control (LCR) que contiene secuencias de ADN que permiten el control de la replicación y la expresión del genoma viral [16,17].

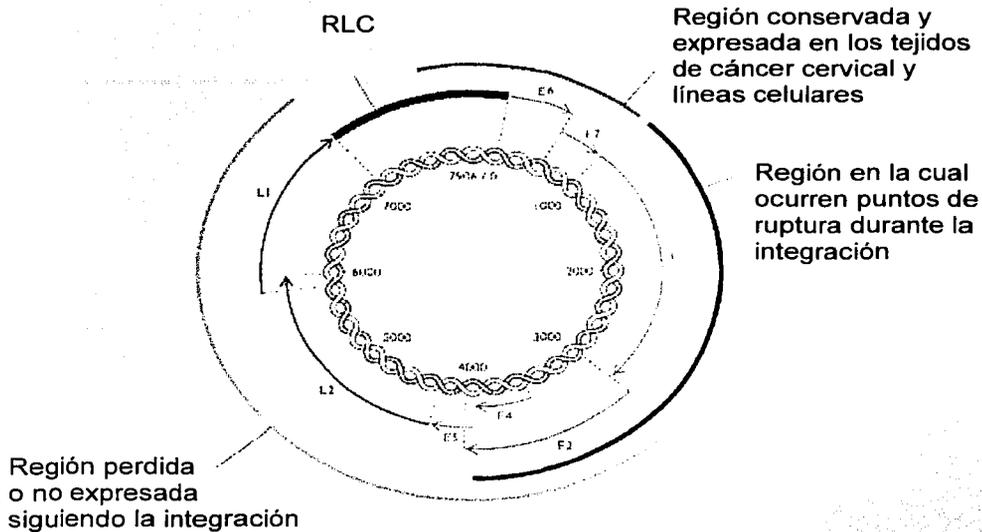


Figura 1. Genoma del VPH 16. Presenta ADN de doble cadena con aproximadamente 8 Kb de longitud, su genoma tiene tres regiones básicas: Una región reguladora (RLC) que contiene los controles de replicación y transcripción, una región de genes que se expresan tempranamente (Proteínas E1, E2, E5, E6, E7) los cuales participan en la activación de la transcripción, transformación y replicación, por ultimo una región de genes tardíos (L1, L2, E4) responsables de la formación y maduración de las proteínas virales [18].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La región del ADN denominada L1 codifica la proteína mayor de la cápside, que tiene un peso molecular de 55,000 daltons; ésta es una región altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH. La región denominada L2 codifica proteínas que son componentes estructurales adicionales de la cápside viral. La proteína de la región L2 está menos conservada y tiene un peso molecular de 75,000 daltons. Las estructuras protéicas que no encapsulan el ADN, confieren resistencia a temperaturas de hasta 56°C y solventes orgánicos [15,16].

#### Región LCR

La región LCR cubre cerca del 10% del genoma del VPH, la regulación de la expresión del gen viral es compleja y controlada por los factores de transcripción viral y celular [15]. Muchas de esas regulaciones ocurren dentro de la LCR la cual varía sustancialmente en la composición de los nucleótidos entre cada tipo de VPH. Dentro de esta región existen los reguladores de la transcripción que son los genes E6 y E7, estos genes son de transcripción para la inmortalización y para mantener al fenotipo del VPH maligno. En la LCR se han identificado áreas de transcripción celular, donde se identifican los VPH 16 y 18 [17].

#### Región Temprana E

La región E regula principalmente las funciones de enlace que persisten en el genoma, la replicación y la activación del ciclo celular y está compuesta por varias proteínas oncogénicas E1, E2, E5, E6 y E7 [16,17].

## Proteína E2

La proteína viral E2 codifica dos o probablemente tres proteínas, todas actúan como factores de transcripción. Éstas afectan la expresión del gen viral y representan principalmente los reguladores intragenómicos que forman dímeros para cada sitio específico. La proteína viral E2 juega un papel muy importante en la activación y supresión de los oncogenes E6 y E7 para la regulación celular e intragenómica de éstos [17,19].

En los VPH 16 y 18 la proteína E2 funciona como un activador de transcripción para el cáncer de cérvix. La regulación de transcripción de la proteína E2 interactúa con la proteína E1 estimulando al ADN viral en su replicación [17,19].

## Proteína E1

La proteína viral E1 tiene un sitio específico en el ADN con funciones bien determinadas, esencialmente la de replicación de los papilomavirus [17].

## Proteína E5

La proteína viral E5 es un estimulador de crecimiento del virus, su participación en la transcripción es poca, ya que frecuentemente está borrada en las neoplasias malignas del cérvix, sin embargo, en etapas tempranas de la infección de VPH siempre está presente [16,17].

## Proteína E4

La proteína viral E4 es un gen de producto temprano y funciona alterando la matriz celular. Está localizada exclusivamente dentro de las diferentes capas del epitelio

infectado. Interviene en la infección productiva, probablemente interrumpiendo la diferenciación celular normal y estableciendo condiciones favorables para la maduración viral. E4 se origina desde el ARN de transcripción viral formando una sola cadena, al inicio de la apertura se integran los genes E1 y E4 en la célula hospedera, donde el ARN mensajero es el principal transcriptor en la lesiones inducidas por VPH [17,19].

#### Proteínas E6 y E7

Las proteínas virales E6 y E7 son reguladores de crecimiento viral, siendo responsables probablemente de la inmortalización de los queratinocitos humanos. Los tipos de VPH que codifican los genes E6 y E7 son frecuentemente encontrados en neoplasias malignas y considerados de alto riesgo. Estos oncogenes interactúan en la supresión de las proteínas reguladoras celulares p53 y Rb [16,17].

#### El ciclo vital de los VPHs.

Los papilomavirus parecen compartir una organización genética similar, con ciertas diferencias tanto en las funciones de los genes virales, como en la regulación en la expresión de ellos [17].

El genoma de VPH se encuentra en estado episomal en la mayoría de las lesiones benignas como verrugas genitales, papilomas y displasias del cérvix. Sin embargo, no sucede así en los cánceres donde el genoma suele integrarse a la diferenciación de la célula huésped, presentándose en tipos de VPH de alto riesgo [16-18].

En la fase de incubación del ADN viral se producen múltiples copias del genoma viral en la célula hospedera. La integración ocurre en la región de los genes E1-E2 dando como resultado la pérdida de la integridad celular y la expresión del gen E2.

Con ésto, la proteína E2 no puede reprimir al promotor de transcripción de los genes E6 y E7, por lo cual permite la sobre-expresión de estos oncogenes de regulación del crecimiento viral que generalmente están asociados a cánceres. Durante la infección latente, el genoma viral persiste, pero no hay partículas infecciosas y la célula no se destruye [16-19].

Los oncogenes E6 y E7 inactivan y suprimen a las proteínas p53 y Rb, ésto causa la inestabilidad genética o carcinogénesis celular [17].

La replicación del ADN viral y la expresión de los oncogenes están muy relacionadas con la diferenciación de los queratinocitos, así como con la inmortalización de éstos. La inactividad funcional del p53 y el Rb producidas por los genes E6 y E7 actúan indirectamente como factores de progresión en la infección por VPH y posiblemente no tiene un papel directo en la inmortalización y transformación celular [17,19].

#### VPBs de alto y bajo riesgo

Se han descrito más de 100 tipos diferentes de VPBs casi todos se encuentran asociados a una serie de lesiones epiteliales benignas, en su mayoría hiperplasias y solo unos cuantos tipos virales pueden desarrollar neoplasias malignas [20].

Algunos tipos de VPH se conocen como "virus de bajo riesgo" porque raramente transforman los epitelios en neoplasias malignas. Éstos incluyen: 2, 6, 11, 13, 32, 42, 43 y 44, generalmente se encuentran asociados a lesiones benignas como papilomas y verrugas genitales. Los tipos de VPH que pueden transformar un epitelio en carcinoma se conocen como "virus de alto riesgo" e incluyen a: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 y 58 [20,21].

Los virus de bajo riesgo que se presentan más frecuentemente en lesiones benignas como verrugas genitales, condilomas y en algunos otros sitios genitales son el 6 y el 11. Asimismo, los virus de alto riesgo que aparecen con más frecuencia son los tipos 16 y 18 (60%) sobre todo en el carcinoma de cérvix y anogenital [21].

#### Antecedentes de VPH

Las primeras investigaciones del virus del papiloma humano fueron hechas en 1969 por la International Agency of Research Cancer (IARC). Con base en estas investigaciones, en 1971 esta agencia estableció los criterios de los riesgos carcinogénicos en humanos [16].

Koss y Durfee acuñan el termino coilocito atípico en 1956, con base en las características de lesiones cérvico-uterinas. Ellos describen que éstas son células epiteliales alargadas, con núcleo hiper cromático y un halo perinuclear claro [22].

En 1977, aparecen los primeros estudios citopatológicos que demostraron que la coilocitosis, era un cambio citológico, característico de las células infectadas por VPH.

En 1983, se vinculó al VPH con cáncer cérvico-uterino. Además, se pudo aislar y caracterizar el VPH tipo 16 [16].

En 1985, De Villers encontró VPH-16 en pacientes con carcinoma epidermoide bucal [24]. En 1989 Chang encontró VPH-16 en 13/17 pacientes con carcinoma epidermoide bucal consumidores de tabaco [25]. No es sino hasta el año de 1995 en que la IACR reconoció a los tipos de alto riesgo VPH 16 y 18 como carcinogénicos en seres humanos [20].

La transmisión del VPH se facilita por la presencia de superficies epiteliales descamadas o ulceradas [26]. Las infecciones anogenitales son principalmente transmitidas por contacto sexual [27]. El ADN del VPH raramente se detecta en personas jóvenes que no han tenido contacto sexual [28]. Existe evidencia de una correlación directa entre el número de parejas sexuales y la prevalencia de la infección por VPH [29,30].

El contacto oro-genital puede conducir a infecciones del virus en sitios bucales por VPHs anogenitales. La transmisión por medio de saliva puede ser otro mecanismo de infección [31, 32].

La transmisión del virus puede ser por instrumental médico, por las puntas del laser y ocasionalmente las infecciones por VPHs anogenitales se transmiten digitalmente desde un epitelio a otro, sin embargo, la historia natural del papilomavirus aún no esta totalmente definida [33].

En 1998, Schwartz informó sobre una posible vía transmisión de la infección con VPH, en sujetos con actividad sexual oro-genital, y en sujetos con múltiples parejas sexuales. Encontrando que el 16.5% de los sujetos tenían carcinoma epidermoide bucal con la presencia de VPH del tipo 16 y ellos también habían referido los hábitos de tabaco y alcohol [34].

El VPH se asocia como factor causal en cáncer de cérvix y tracto ano-genital hasta en un 99%. Actualmente, se ha encontrado en neoplasias malignas de cabeza y cuello, se considera a la infección del VPH como un cofactor en el desarrollo de carcinoma epidermoide en la cavidad bucal, en particular los VPHs de alto riesgo como los tipos 16 y 18 [35].

En el año 2001, Mork realizó un estudio de cohorte en los países nórdicos, se examinó la relación entre cánceres de cabeza y cuello y los VPHs; se seleccionaron 900,000 sujetos, de los cuales 292 presentaron cáncer de cabeza y cuello durante 9.4 años; aquellos que tenían historia de cáncer anogenital, el riesgo relativo fue 4.3 veces mayor a presentar cáncer de cabeza y cuello, se encontró presencia de VPH en el 12% de los pacientes estudiados [36].

En un estudio reciente, Brown y cols analizaron con PCR, la presencia de VPH en neoplasias malignas de cabeza y cuello, encontrando que en el 36.4% eran VPHs tipos 16 y 18, pero no relacionaron el tabaco ni el alcohol en estos casos [37,38].

Otro estudio realizado por Schwartz en 254 pacientes con carcinoma epidermoide bucal encontró positividad para VPH-16 en el 15.1%; todos ellos se asociaron con hábitos de tabaco y alcohol [39].

McKaig determinó la prevalencia de VPH en neoplasias malignas de cabeza y cuello en un 34.5%, la mayoría de éstas fueron positivas para VPH, las cuales contenían los tipos de alto riesgo como el 16 en un 40% y el 18 en un 11% [40].

En otro estudio, Shah informó que la prevalencia de VPH podía variar desde un 31% al 74% en el carcinoma epidermoide bucal [41].

En México se desconoce el porcentaje de pacientes con carcinoma epidermoide bucal infectados con VPH. Se decidió realizar un estudio para conocer el porcentaje de infección por VPH y los tipos más frecuentes en un grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide bucal quienes asistieron en busca de atención médica al INCan, México D.F.

### **III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las neoplasias malignas de la cavidad bucal pueden desarrollarse por factores de riesgo como el uso de tabaco, consumo de alcohol y agentes infecciosos virales.

En este estudio se pretende determinar si la infección con VPH es un factor para el desarrollo del carcinoma epidermoide en la cavidad bucal, ya que los hábitos e infecciones crónicas en un individuo son factores que pueden desencadenar procesos de carcinogénesis.

### **IV.- JUSTIFICACIÓN**

Es necesario realizar un estudio para evaluar si existe la presencia VPH asociada al carcinoma epidermoide de la cavidad bucal; ya que esta infección se considera un cofactor para el desarrollo de carcinoma epidermoide bucal y se debe conocer la relación de ésta con otros factores de riesgo como tabaco y alcohol.

### **V.- HIPÓTESIS**

El VPH se encuentra presente en las células epiteliales neoplásicas de pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.

### **VI.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar el porcentaje de VPH asociado al carcinoma epidermoide de la cavidad bucal y su relación con los hábitos de tabaco y alcohol.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Detectar VPH por el método de PCR en pacientes con carcinoma epidermoide bucal.
- Identificar los tipos de VPH por el método de PCR que se presentan en el carcinoma epidermoide de la mucosa bucal.
- Determinar la frecuencia de VPH de acuerdo a los sitios anatómicos de la cavidad bucal.
- Analizar el consumo de tabaco y alcohol relacionados con pacientes con carcinoma epidermoide bucal y su relación con presencia o ausencia de VPH.

## **VII.- METODOLOGÍA**

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

A cada uno de los pacientes seleccionados se les aplicó un cuestionario elaborado para este estudio (Anexo 1), con carta de consentimiento informado autorizada por él (Anexo 2), se les dio información general sobre el objetivo del cuestionario y posteriormente se realizó la biopsia incisional de la lesión la cual fue dividida en dos partes: una parte se llevó a estudio histopatológico, verificando su diagnóstico de carcinoma epidermoide y la otra parte fue congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser posteriormente analizada por PCR para detectar VPH e identificar los tipos.

#### **Método de Recolección.**

Se diseñó un cuestionario cuyo objetivo fue recolectar información de los casos con carcinoma epidermoide bucal para determinar la presencia de VPH y la relación, si existía, con otros factores de riesgo como los hábitos de tabaco y alcohol.

Cada uno de los pacientes que fueron invitados a participar, firmaron una carta de consentimiento, en la cual se les informaban los procedimientos del trabajo; así como las obligaciones de los investigadores, los derechos y beneficios de los firmantes.

El cuestionario fue aplicado como entrevista personal, con preguntas cerradas, de tipo cuantitativo, leyéndose al paciente cada una de las preguntas en voz alta.

El cuestionario fue estructurado con: datos personales, demográficos, clínicos ( índice de Karnofsky, Anexo 3), patológicos, hábitos de consumo de tabaco y alcohol, higiene bucal, así como datos de infección viral con VPH y subtipos [42].

### Técnica de Biopsia.

Los pacientes con carcinoma epidermoide bucal que aceptaron y firmaron la carta de consentimiento, se les realizó una biopsia incisional de la parte más representativa de la neoplasia. Este procedimiento se realizó bajo anestesia local, utilizando la técnica ya descrita para el corte con bisturi convencional tratando de no comprimir el tejido [43]. La muestra de la lesión se dividió en dos partes; una parte fue colocada en formol para su estudio y diagnóstico histopatológico y la otra parte fue depositada en un tubo de Eppendorff, congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  y posteriormente procesada para determinar la presencia de VPH utilizando la técnica de PCR e identificar los subtipos.

El estudio histopatológico se realizó en cada una de las muestras, donde fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Cuando se obtuvieron los bloques, se les realizaron cortes para colocarlos en las laminillas; éstas fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina, y se revisaron bajo el microscopio de luz por un patólogo experto.

### Método de Registro y Análisis Estadístico.

Los datos recolectados del procesamiento de las muestras y de las encuestas fueron capturados en el paquete Excel versión 2000 de MSOFFICE 2000 para PC. Para analizar la base de datos se utilizó el paquete estadístico STATA versión 5.0 para PC. Las frecuencias y porcentajes de cada una de las variables fueron obtenidas. Posteriormente, se realizó el análisis de acuerdo a la presencia de VPH con cada una de las variables. Para evaluar las diferencias en la distribución se utilizó la prueba de Ji-cuadrada, la prueba exacta de Fisher y la prueba t de Student, con un nivel de significancia del 95%.

## **UNIVERSO.**

La población en este estudio fueron pacientes mayores de 19 años, de ambos sexos, que se presentaron de primera vez al Departamento de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología. México, D. F. sin tratamiento previo.

## **MUESTRA.**

Se seleccionaron aleatoriamente un total de 51 pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide, ninguno ellos había recibido tratamiento previo para su padecimiento.

## **CRITERIOS DE EXCLUSION**

Pacientes incapacitados, con problemas neurológicos y aquellos que presentaron carcinoma epidermoide de labio.

## **VARIABLES**

VARIABLES INDEPENDIENTES.

Datos demográficos: Edad, sexo.

Higiene bucal, Infección por VPH y hábitos de tabaco y alcohol.

VARIABLES DEPENDIENTES.

Datos Clínicos: Karnofsky, tamaño del tumor, TNM, sitio del tumor, tiempo de evolución, carcinoma epidermoide y grado histológico.

## ESCALA DE MEDICIÓN.

Edad en años, sexo en masculino y femenino, tiempo de evolución en meses, sitio de la lesión en el área de la cavidad bucal, tamaño de la lesión en las etapas clínicas TNM (AJCC -1997), tabaco: forma, tipo y cantidad, alcohol: tipo y cantidad, higiene bucal: buena, regular y mala, antecedentes personales: enfermedades congénitas, alérgicas, desordenes mentales, trastornos cardiovasculares y otros.

Escala ordinal o de Likert [44].

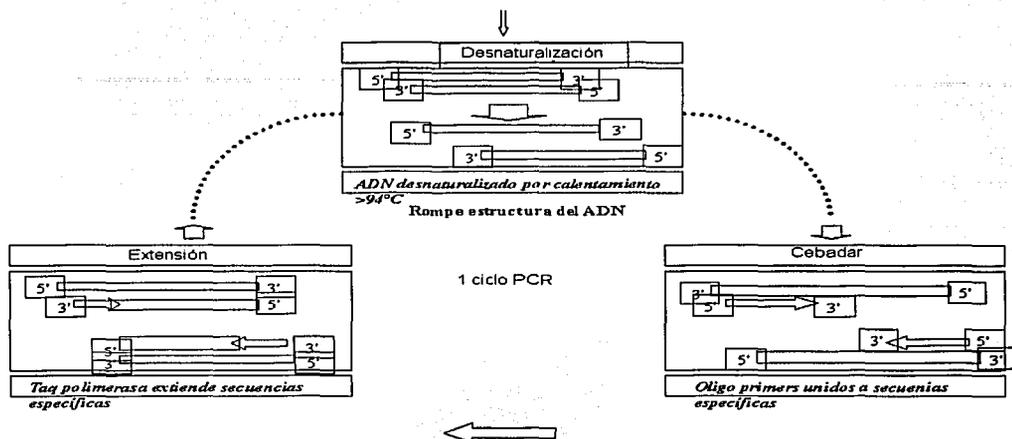
## OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Se utilizó para obtener la detección de VPH la técnica de PCR.

El PCR está constituido por ciclos continuos y cada ciclo consta de tres pasos para su amplificación y son repetidos en el mismo orden, éstos son: la desnaturalización, cebación y alineamiento. La desnaturalización del ADN se obtiene al calentar a 94°C donde se rompe la estructura de la doble cadena, separándose y quedando sólo una banda lineal del ADN. Esta banda permanece separada hasta que la temperatura varía de 35°C–55°C para continuar con el siguiente paso que es la cebación donde se realiza el reconocimiento de los primers universales o generales los cuales tienen un tamaño 20–25 pares de bases (pb) específicos para la región del virus y finalmente la extensión de los primers a temperatura de 72°C donde interviene la Taq polimerasa. Enzima que amplifica el ADN, teniendo como función unir, encontrar y reconocer el sentido en que se van a extender los oligonucleótidos.

Estos tres pasos comprenden un solo ciclo de PCR, la reacción se somete a 40 ciclos, para obtener la cantidad suficiente de ADN viral en cada ciclo (Fig. 2).

## PCR- Técnica de amplificación que involucra ciclos repetidos en tres pasos



La reacción PCR se somete a 40 ciclos de amplificación  
Figura 2. Esquema de un ciclo de PCR [45]

Todas las reacciones se efectuaron dentro de la cámara de flujo laminar para evitar contaminación. La confirmación de los productos amplificados se realizó por medio en gel de agarosa al 2%, el cual fue colocado en una cámara de electroforesis y los resultados obtenidos fueron vistos a través del transiluminador de luz UV.

Las reacciones de amplificación se realizaron con termocicladores programables de PCR (Perkin Elmer Thermal Cycler 480 y Techne Genus) éstos efectuaron todos los ciclos continuos.

Procedimientos del Método de PCR .-

Procedimientos que se realizaron en cada una de las muestras en este estudio:

- 1) Digestión del tejido, 2) Extracción de ADN, 3) Cuantificación de ADN por espectrofotometría, 4) Amplificación de  $\beta$ -globina. (método de comprobación de ADN en

la muestra), 5) Amplificación a la región L1 con primers universales: MY09/MY11 - GP5/GP6, 6) Amplificación para VPH-16 y 18 con primers específicos: E6 HZ27/HZ28 - LCR18 a/b, 7) Método de análisis de productos de la amplificación por PCR.

### 1.- Digestión del Tejido

La digestión del tejido de cada una de las muestras con proteinasa K fue la siguiente: 200 mg del tejido muestra fueron descongelados y macerados hasta tener una masa homogénea, ésta fue llevada a tubo de Eppendorff. Se le colocaron 500µL de buffer de lisis y 6µg de proteinasa K, se llevó al vórtex por 1 min y se dejó a temperatura de 55°C. La mezcla fue centrifugada a 300 rpm en el thermomixer Eppendorff durante toda la noche.

### 2.- Extracción de ADN

Los tubos fueron retirados del thermomixer y se les colocaron 500µL de sol. fenol/cloroformo (1:1v/v) a cada una de las muestras, éstas fueron mezcladas en el vórtex por un minuto y posteriormente se colocaron en la centrifuga a 12,000 rpm por 10 min. Los tubos se retiraron de la centrifuga, observándose una fase acuosa y otra fase densa; se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos, la fase densa se desechó.

En los tubos que contenían la fase acuosa se agregaron 500µL de sol. cloroformo/alcohol isoamílico (24:1v/v), éstos se mezclaron en el vórtex y posteriormente se llevaron a la centrifuga a 12,000 rpm por 10 min, se retiraron los tubos de la centrifuga, se extrajo la fase acuosa y ésta se colocó en tubos, la fase densa no se utilizó.

Se agregaron 1,000  $\mu$ l de etanol al 100% y 40  $\mu$ L de acetato de amonio en los tubos que contenían la fase acuosa, colocándose en el congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 hr. Una vez concluido el tiempo se retiraron de éste, llevándose a la centrifuga a 12,000 rpm x 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , al finalizar el tiempo fueron retirados los tubos y se decantó el etanol.

El botón se licuó con 500 $\mu$ L de etanol al 70%, el cual fue decantado, dejándose secar a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 1 hr.

Dependiendo de la concentración de la muestra, se resuspendió en 20 $\mu$ L a 40 $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, todas las muestras fueron colocadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs.

Las muestras fueron retiradas del refrigerador y se colocaron durante 5 min a  $55^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se mezclaron en el vórtex por 1 minuto y se pusieron en la centrifuga a 12,000 rpm durante 5 min, con este procedimiento se pudo obtener la purificación del ADN.

### 3.- Cuantificación del ADN por Espectrofotometría

La cuantificación del ADN purificado se efectuó por medio del espectrofotómetro el cual se calibró a 260/280nm con luz UV [46].

De acuerdo al valor de la lectura y concentración final de las muestras, se procedió a realizar diluciones por medio de la siguiente fórmula:  $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

Formula:  $\frac{V1 \cdot C2}{C2} = V2$  (?)

C2

### 4.- Amplificación de $\beta$ -globina (Método de Comprobación de Contenido de ADN)

La amplificación de  $\beta$ -globina comprobó que el material obtenido de cada una de las muestras contenía el ADN adecuado para ser amplificado por PCR.

A cada una de las diluciones se les amplificó un fragmento de un gen conservado de  $\beta$ -globina y para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

PCO4 : 5' -CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

GH20: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'

Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 268 pb [47,48].

La reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación y el producto amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y leído a través del transiluminador de luz UV, las muestras que resultaron positivas para  $\beta$ -globina fueron sometidas a amplificación para detectar VPH.

#### 5.- Método para Detectar VPH por PCR

##### Amplificación de la Región L1 con Primers Universales

Las muestras que fueron positivas para  $\beta$ -globina, fueron llevadas a amplificación de la región L1 del genoma del virus; siendo ésta la más conservada, lo que permite efectuar la detección de una gran variedad de tipos virales mediante oligonucleótidos universales. Como primera opción, todas las muestras se amplificaron con oligonucleótidos MY09/MY11 que amplifican un fragmento de 450 pb de la región L1 de VPH [47,49-52].

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

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

La reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación.

Para ampliar el rango de detección de VPH, las muestras que resultaron negativas con los primers MY09/MY11 fueron amplificadas con otros oligonucleótidos los GP5/GP6,

éstos amplifican un fragmento de 150 pb de la región L1 del VPH [51].

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

GP6 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'

La reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación.

#### 6.- Método para Determinación del Tipo de VPH

Las muestras VPH(+) fueron tipificadas, se utilizaron los primers específicos E6 HZ27/HZ28 para identificar el tipo 16 y LCR 18 a/b para el tipo 18 [53-56].

La amplificación se sometió a 40 ciclos.

#### 7.- Método de Análisis de Productos Amplificados por PCR Confirmados por Electroforesis en Gel de Agarosa [45,46]

Preparación del gel de agarosa para la cámara de electroforesis:

Se mezclaron 2gr de agarosa al 2% en 100 $\mu$ L de Buffer TB1X, a una temperatura 190°C, se agregaron 5 $\mu$ L de bromuro de etidio, quien se intercala entre las bases de ADN y fluoresce a una longitud de onda de 260nm, ésto permitió la detección del producto del ADN en el gel de agarosa.

El gel de agarosa se llevó a la cámara de electroforesis en donde se vaciaron las muestras en las rejillas. Se les colocaron 3  $\mu$ L de colorante, el cual sirvió como marcador de banda, ayudó a dar peso a las bandas y a que éstas se desplazaran a la velocidad del ADN, también sirvió para observar que la banda no saliera del gel.

Además de las muestras a analizar, en el gel se colocaron marcadores de peso molecular que va de 100 en 100 pares de bases, con ésto se conoció el tamaño de la

banda.

Los marcadores de banda consisten en ADNs que han sido digeridos con diferentes enzimas de restricción, generando fragmentos de ADN de tamaños conocidos.

El control (-) fue la reacción y el control (+) fue ADN de líneas celulares que contienen VPH-16 o 18, respectivamente (Caski o HeLa).

Una vez cargado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis, conectándose a la fuente de poder con voltaje que varió de 80 a 100 Volts, éste se ajustó dependiendo del tamaño de la cámara en uso.

La confirmación del producto de amplificación pudo observarse con el gel de agarosa, el cual se mantuvo dentro de la cámara de electroforesis durante 45 min aproximadamente. En él se desplazaron las bandas y una vez concluido el tiempo, se retiró el gel de la cámara y se llevó al aparato transiluminador de luz UV a través del cual observamos bandas que se encontraban dentro del tamaño de pares de bases de los primers seleccionados para la detección de cada reacción. Estas últimas fueron consideradas como bandas positivas cuando coincidían con el peso esperado.

#### RECURSOS.

Recursos Materiales: Áreas Clínica, Investigación Básica y Patología.

Recursos Humanos: Tutor, Investigador, Patólogo y Pacientes.

Recursos Financieros: Instituto Nacional de Cancerología, México D.F.

#### DISEÑO DEL ESTUDIO.

Es un estudio descriptivo y transversal.

## VIII.-RESULTADOS

Se analizó la frecuencia del carcinoma epidermoide de diferentes localidades de la cavidad bucal en 51 pacientes seleccionados, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

<i>Sitio del tumor</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Lengua móvil	13	25.6
Piso de boca	4	7.8
Encía superior	9	17.6
Encía inferior	10	19.6
Paladar duro	6	11.8
Área retromolar	9	17.6

Los resultados encontrados de las características clínicas y demográficas de los 51 pacientes seleccionados con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal fueron, en cuanto al sexo 36 (70.5%) hombres y 15 (29.5%) mujeres; la edad se presentó con un intervalo 34–88 años, obteniendo una media de 63 años, el Karnofsky se encontró con un intervalo de 70 a 100% presentando una media de 85%. El tamaño tumoral tuvo un intervalo de 2 >4 cm con una media >4.4 cm y la etapa clínica TNM presentó un intervalo de T1 a T4, obteniendo una media de T3. La tabla 2 muestra el TNM de los 51 pacientes seleccionados con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.

Tabla 2

<i>Etapas Clínicas TNM</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
T1	4	7.8
T2	6	11.8
T3	11	21.6
T4	30	58.8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El tiempo de evolución de la neoplasia presentó una media de 7.8 meses con un intervalo de 1a 24 meses.

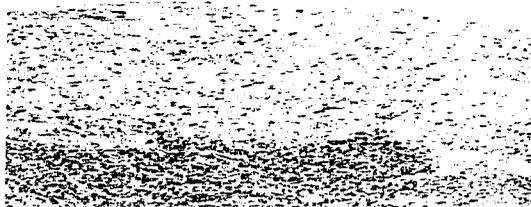
El grado histológico con mayor porcentaje fue el carcinoma epidermoide bien diferenciado con 68.6% y el 31.3% fueron carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado, no se encontró ningún carcinoma epidermoide poco diferenciado.

La figura 3 muestra la imagen de un caso clínico con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal positivo para VPH.

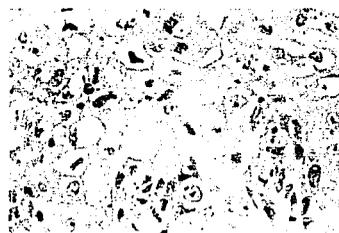


Figura 3. Caso clínico de carcinoma epidermoide de lengua móvil.

En la figura 4 se observan cortes histológicos de carcinoma epidermoide de la mucosa bucal infectado por VPH.



H. E. 100 x



H. E. 400 x

Figura 4. Cortes histológicos de carcinoma epidermoide bucal con VPH presentando abundantes coilocitos en las capas del epitelio.

## Resultados de Hábitos de Tabaco y Alcohol.

Los resultados obtenidos de los hábitos de tabaco y alcohol en los 51 pacientes seleccionados con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal fueron los siguientes, como se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3

### Hábito Tabaco

TABACO		
TIPO	n	%
Mixto	20	55.6
Rubio	4	11.1
Oscuros	1	2.8
Otros	11	30.5
Presente	36	70.6
Ausente	15	29.4
Total	51	100

TABACO		
FORMA	n	%
Cigarro	34	94.4
Puro	1	2.8
Masticado	1	2.8
Presente	36	70.6
Ausente	15	29.4
Total	51	100

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4

Hábito Alcohol.

ALCOHOLISMO		
TIPO	n	%
Pulque/ *aguardiente/ cerveza	25	61.0
Pulque/ aguardiente/ brandy/ cerveza	12	29.3
Aguardiente/ cerveza/ ron/ brandy	3	7.3
Pulque/ aguardiente/ ron/ cerveza	1	2.4
Presente	41	80.3
Ausente	10	19.7
Total	51	100

\*Aguardientes = Tequila, mezcal y aguardiente

Los 51 pacientes seleccionados con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal mostraron la combinación de los hábitos de tabaco y alcohol como se presenta en la tabla 5.

Tabla 5

TABACO / ALCOHOL		n	%
+	+	33	64.7
+	-	3	5.9
-	+	8	15.7
-	-	7	13.7
<i>Total</i>		51	100

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Resultados de las 51 muestras seleccionadas analizadas por el método de PCR.

Resultados de la Amplificación de  $\beta$ -Globina.-

Se comprobó que 50 muestras eran positivas para  $\beta$ -globina, las cuales contenían el material adecuado de ADN para ser amplificadas por PCR para detectar VPH (Fig. 5).

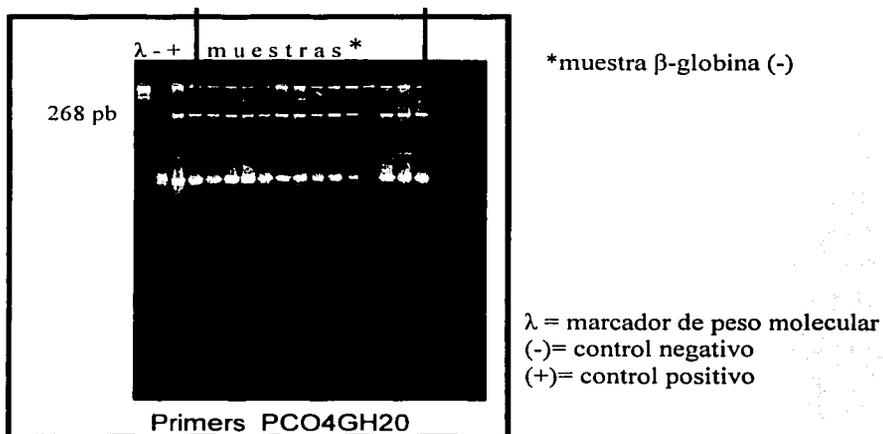
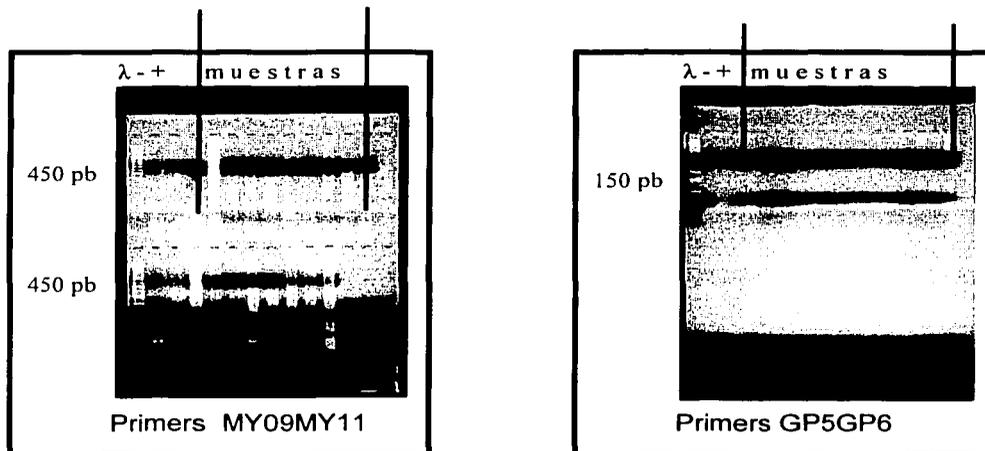


Figura 5. Gel de agarosa visto a través de un transiluminador de luz UV, donde se observa las bandas (+) para  $\beta$ -globina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Resultados de la Amplificación para Detección de VPH por PCR.

De las 50 muestras positivas de  $\beta$ -globina, 21(42%) fueron VPH (+) (Fig.6).



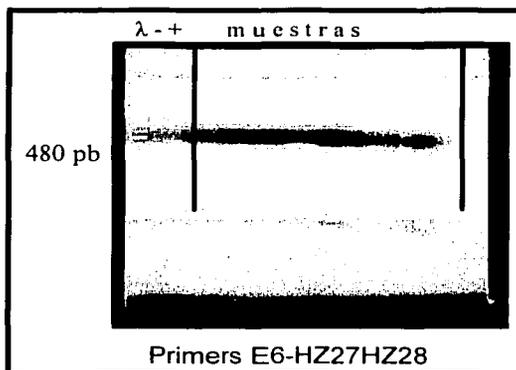
$\lambda$  = marcador de peso molecular, (-) = control negativo, (+) = control positivo

Figura 6. Geles de agarosa vistos a través de un transiluminador de luz UV donde se observan bandas (+) para VPH detectadas con primers universales por PCR.

TRABAJOS COMPLETADOS  
FALLA DE ORIGEN

### Resultados de la Amplificación para Identificar VPH Tipos 16 Y 18.

De las 21 muestras positivas de VPH, se encontraron 14 (66.6%) positivas para VPH-16 y 7 (33.4%) de las muestras eran negativas. No se encontró ningún caso de VPH-18 (Fig.7).



λ= marcador de peso molecular ; (-) = control negativo; (+) = control positivo

Figura 7. Gel de agarosa visto a través de un transiluminador de luz UV donde se observan bandas(+) de VPH-16 por PCR.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Resultados de las 50 casos seleccionados:

Las 50 muestras seleccionadas y procesadas por el método de PCR, fueron analizadas de acuerdo a la distribución del VPH y características clínicas de cada paciente con carcinoma epidermoide bucal (tabla 6).

Tabla 6. Distribución de VPH y características clínicas con carcinoma epidermoide bucal en los 50 pacientes seleccionados.

	VPH (+)		VPH (-)	
<i>SITIO DEL TUMOR</i>	n= 21	%	n= 29	%
Lengua Móvil	7	33.4	6	20.7
Piso de Boca	3	14.3	1	3.5
Encía Superior	4	19.0	5	17.2
Encía Inferior	2	9.5	8	27.6
Paladar Duro	1	4.8	4	13.8
Área Retromolar	4	19.0	5	17.2
<i>GRADO HISTOLÓGICO</i>				
Bien Diferenciado	12	57.1	22	75.9
Moderadamente Diferenciado	9	42.9	7	24.1
<i>ETAPA CLÍNICA TNM</i>				
T1	0	0.0	4	13.8
T2	2	9.5	3	10.3
T3	6	28.6	5	17.2
T4	13	61.9	17	58.7

La mayoría de estos pacientes VPH(+) estaban en etapas avanzadas de la enfermedad, presentaron carcinoma epidermoide bien diferenciado el 57.1%. No hubo diferencias en el tamaño tumoral y la localización observadas en ambos grupos VPH (+) y VPH (-).

Resultados de los Hábitos de Tabaco y Alcohol de acuerdo a la distribución de VPH.

Los resultados del consumo de tabaco y alcohol con respecto a VPH como se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Hábitos de tabaco y alcohol en los casos VPH (+) y VPH (-).

Tabaco / Alcohol		VPH (+)		VPH (-)	
		n = 21	%	n = 29	%
(+)	(+)	15	71.4	17	58.6
(+)	(-)	0	0.0	3	10.3
(-)	(+)	2	9.5	3	10.3
(-)	(-)	4	19.1	6	20.6

En esta tabla se observa que la distribución de VPH con respecto al consumo de tabaco y alcohol no existieron diferencias significativas en ninguno de los grupos (71.4% vs. 58.6%)  $\chi^2$ ; p > 0.05.

En el caso de consumo de alcohol no se encontraron diferencias en los pacientes con VPH(+) y VPH(-) (9.5% vs 10%)  $\chi^2$ ; p > 0.05.

Resultados de la Relación de VPH con los Hábitos de Tabaco y Alcohol en Ambos Sexos.

Los casos VPH(+) y VPH(-) se relacionaron con el consumo de tabaco y alcohol en ambos sexos como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Hábitos de tabaco y alcohol en ambos sexos con VPH (+) y VPH (-).

		VPH (+)						VPH (-)			
		Hombres		Mujeres				Hombres		Mujeres	
TABACO	ALCOHOL	n=15	%	n=6	%	TABACO	ALCOHOL	n=21	%	n=8	%
(+)	(+)	14	93.3	1	16.7	(+)	(+)	15	71.4	2	25.0
(+)	(-)	0	0.0	0	0.0	(+)	(-)	0	0.0	3	37.5
(-)	(+)	0	0.0	2	33.3	(-)	(+)	3	14.3	0	0.0
(-)	(-)	1	6.7	3	50.0	(-)	(-)	3	14.3	3	37.5

6 (12%) de los casos con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal no consumían tabaco ni alcohol, y no se encontró VPH.

Resultados de la Duración e Intensidad de los Hábitos de Tabaco y Alcohol.-

No presentaron diferencias de duración e intensidad de estos hábitos en los 50 pacientes evaluados con presencia y ausencia de VPH. Se encontró que el 80.9% de los casos VPH(+) consumían tabaco y alcohol, al igual que los casos VPH(-) 79.3%, el 19% de cada grupo no presentaron hábitos.

La duración e intensidad del consumo del tabaco, entre los casos VPH(+) y los casos VPH(-) tuvo una media de 38.3 años vs 29 años y un promedio de 9 cigarros por día; lo mismo pasó en la relación del consumo de alcohol en los casos VPH(+) y los casos VPH(-) la media fue de 33 años vs 32 años y un promedio de 910 ml por día.

Otro factor evaluado fue la higiene bucal en los pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal con y sin VPH, encontrando mala higiene bucal en ambos grupos.

## **IX.- DISCUSIÓN**

Desde los años 70s se establecieron los criterios de riesgo carcinogenico en humanos, asociándose como un cofactor de riesgo a la infección por VPH en el cáncer cervicouterino; más tarde, a principios de los 80's, algunos investigadores realizaron estudios en pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal y establecieron que el VPH era un probable factor de riesgo en el cáncer epidermoide bucal; ésto tal vez se debe a que el VPH tiene preferencia por el tejido epitelial [16].

Actualmente, en los humanos se han descrito más de 100 tipos diferentes de papilomavirus, y éstos están asociados a lesiones epiteliales benignas y malignas, los VPHs se dividen en tipos de alto riesgo y de bajo riesgo [20].

Los VPHs de bajo riesgo tipos 6 y 11 son asociados más frecuentemente a lesiones benignas como papilomas, verrugas genitales y condiloma, entre otros. Los VPHs de alto riesgo tipos 16 y 18, están asociados a canceres y en el 100% con el carcinoma de cérvix [17-19]. Ésto fue aceptado en 1995 por un grupo de expertos investigadores y la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), a través de estudios moleculares [20].

La detección de VPH de acuerdo a varios informes realizados por Thing y cols., Qu y cols., Shoyer y cols., [49,51,65] fue confirmada por el método de PCR, ellos utilizaron numerosas combinaciones con diferentes primers para la amplificación de fragmentos de ADN del VPH, encontrando a la región L1 la más conservada y tardía para la detección, donde comprobaron que los primers universales MY09/MY11 y GP5/GP6 eran los más útiles para la detección de ADN del virus en las muestras clínicas.

Por métodos parecidos a los usados en este estudio, Gopalakrishnan y col [48] encontraron la presencia de VPH en un 31% de pacientes con carcinoma epidermoide bucal. En este estudio se encontró la presencia de VPH el en carcinoma epidermoide bucal en un 42% de los casos, resultados parecidos a los de Gopalakrishnan y col.

Miller y White en 1996, realizaron un estudio retrospectivo donde se analizaron informes de la asociación entre el VPH y datos epidemiológicos. En dicho estudio utilizaron el método de PCR para la detección de VPH, habiendo confirmado la presencia del virus en el carcinoma epidermoide en un 26.2%, en el carcinoma in-situ éste fue del 18.5%, en las lesiones premalignas en un 14.8%, y en la mucosa normal en un 13.5%. Estos mismos casos fueron también tipificados para identificar VPHs de alto riesgo tipo 16 y 18, encontrando la presencia de éstos, en un 80% en el carcinoma epidermoide, en la neoplasia intraepitelial en un 75%, en las lesiones premalignas en un 5% y en la mucosa bucal normal en un 53% [57]. Este estudio mostró el 66.6% de VPH-16 con carcinoma epidermoide

En 1997, McKaig informó que la prevalencia de VPH en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, había sido evaluada por varias técnicas: por PCR se encontró que 34.5% (1,205) de los casos eran VPH (+), a diferencia del método de hibridación in-situ donde ésta fue del 15.8% y con el método de Southern Blot, el 24.5% de casos fueron VPH(+). También se evaluó en este estudio por medio de PCR la presencia de VPH en el carcinoma epidermoide bucal encontrándolo en un 59%, se estudiaron los sitios anatómicos de la boca donde se presentaba con mayor frecuencia, detectándose la presencia de VPH en lengua móvil en un 35% [40]. Este porcentaje es similar a lo

informado en este estudio donde el sitio anatómico de mayor frecuencia en la boca fue la lengua móvil en un 33% de los casos positivos para VPH.

En 1997, Paz y cols. estudiaron a un grupo de 167 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y encontraron por medio de PCR la presencia de VPH en un 16% de éstos, siendo el 10% de éstos de la cavidad bucal.

El estudio no encontró diferencias estadísticamente significativas para la asociación entre el consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo, los pacientes positivos para VPH presentaron mayor frecuencia de neoplasias en estadios avanzados T4 (42.9%) [58]. Al igual que en este informe, los pacientes con carcinoma epidermoide bucal infectados por VPH presentaron mayor frecuencia en los estadios avanzados T4 (61.9%).

Gillison informó que los VPHs de alto riesgo son agentes etiológicos de cánceres del tracto anogenital y han sido detectados en cánceres de cabeza y cuello; este investigador realizó un estudio retrospectivo en una serie de 253 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, los cuales fueron analizados por PCR para la detección de VPH, encontrando que el 25% estaban infectados por el virus y el 90% de estos eran positivos para VPH-16 [59].

Mork en el 2001 realizó un estudio de cohorte en los países nórdicos e informó que la prevalencia de VPH era del 12% en neoplasias malignas de cabeza y cuello, donde se analizó a un grupo de 900,000 sujetos, de los cuales 292 presentaron cáncer de cabeza y cuello, en un periodo de tiempo de 9.4 años, y observaron que aquellos pacientes que habían presentado cáncer anogenital tenían un riesgo relativo de 4.3 veces de presentar cáncer de cabeza y cuello [36]. En otra investigación realizada por Mineta y

cols. asociaron a los VPHs tipos 16 y 18 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello; encontraron por el método de PCR, al VPH-16 en el 23% de los casos y al VPH-18 en el 4% [35].

Zur Hausen comenta que los VPHs tipos 16 y 18 han sido encontrados en un 95% en el carcinoma epidermoide bucal, siendo más frecuente el VPH-16 en un 60% y el VPH-18 se ha encontrado en 20% [17]. En este estudio, al igual que el informe anterior, se encontró la presencia de VPH-16 en el 66.6% (14/21) de los casos positivos para VPH, aunque no se encontró VPH 18.

Watts, en 1991 informó que estudios epidemiológicos han señalado la importancia del papel que juega el agente infeccioso en la etiología del carcinoma bucal. Este estudio encontró que la frecuencia del VPH era significativa en cánceres de algunos sitios de cabeza y cuello principalmente los tipo 6,11,16 y 18 [60]. Mashberg y col. sugirieron que el consumo de tabaco y alcohol han sido identificados fuertemente como factores de riesgo de cáncer de cabeza y cuello lo cual podría predisponer la infección hasta un 60% [13].

En 1994, Spitz enumeró una serie de factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de los cánceres de cabeza y cuello. Comentó la interacción entre consumo de tabaco y alcohol asociado a la dieta y la pobre higiene bucal del paciente, en donde las infecciones en la mucosa bucal la hacen más vulnerable a la infección por VPH; la detección de VPH por PCR mostró que la presencia del virus en el carcinoma epidermoide bucal puede variar de un 32% a 100% [11]. Este estudio encontró que todos los pacientes estudiados con carcinoma epidermoide bucal infectados con VPH y

los casos no infectados por el virus presentaron mala higiene bucal, haciendo más susceptible a la mucosa bucal a infectarse.

En 1998, Schwartz y col. informaron que pacientes con carcinoma epidermoide bucal infectados por VPH-16 se presentaron en un 16.5%, se evaluó en ellos el consumo de tabaco y alcohol, encontrando que el 15% de éstos casos infectados presentaban los hábitos [34]. En el estudio presente se trato de relacionar los casos con carcinoma epidermoide bucal infectados por VPH con el consumo de tabaco y alcohol, encontrando que el 80.9% presentaban los hábitos.

En el año 2001, Miller y Johnstone [64] realizaron un estudio de meta-análisis de 1982 a 1997, analizaron 94 estudios donde se incluyeron 4680 muestras de la cavidad bucal; se detectó al VPH en lesiones precancerosas, cancerosas y mucosa normal, pudiendo ser identificados los tipos de VPH de alto riesgo 16 y 18.

La mucosa bucal normal presentó el 10% de infección por VPH, en las lesiones precancerosas el 22.2% y el carcinoma epidermoide el 46.6%. Estos estudios demostraron que el VPH es un cofactor de riesgo para carcinoma epidermoide bucal pero aumentaba el riesgo al asociarse con el consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo, en estudios epidemiológicos el papel del virus en la carcinogénesis bucal aparentemente no es tan importante porque la prevalencia de la infección del VPH es menor que la prevalencia del consumo tabaco y alcohol.

Chang y cols., en 1989 estudiaron un grupo de 17 pacientes con carcinoma epidermoide bucal encontrando la presencia de VPH-16 en el 76.4% de los casos,

éstos se relacionaron solamente con el consumo de tabaco, encontrando que el 70.6% de estos casos presentaban el hábito [25].

En el 2001, Schwartz y Yueh. realizaron un estudio de casos y controles en 254 pacientes con carcinoma epidermoide bucal, por PCR fue detectado el VPH-16 encontrando el 15.1%, los casos infectados fueron asociados con los hábitos de tabaco y alcohol, encontrando que un 64.9% de éstos presentaron consumo de tabaco, el 16.4% consumo de alcohol y el 18% no presentaron hábitos [39]. Al igual que en el informe anterior, este estudio trató de observar la relación entre los pacientes con carcinoma epidermoide bucal infectados por VPH y los hábitos de tabaco y alcohol, se encontró que el 80.9% de los casos portadores de VPH referían ambos hábitos y el 19.1% no presentaban hábitos. Los casos no infectados por VPH mostraron consumo de tabaco y alcohol en el 79.3% y el 20.7% no tuvieron ningún hábito.

Diferentes investigadores informaron que la prevalencia de VPH en el carcinoma epidermoide bucal puede variar de 31% a 74% [17-21,41,59]. La prevalencia de VPH encontrada en este estudio fue del 42% en pacientes con carcinoma epidermoide bucal y el 66.6% de éstos resultaron positivos para VPH-16, porcentajes similares a lo informado en la literatura.

Los pacientes con carcinoma epidermoide bucal infectados y no infectados por VPH en este estudio, se trataron de relacionar con los hábitos de tabaco y alcohol, no se detectaron diferencias en los porcentajes.

Los resultados de este estudio sugieren que la presencia de VPH en el carcinoma epidermoide bucal puede significar que existe una asociación con del desarrollo de la carcinogénesis.

Es importante que el odontólogo identifique lesiones precancerosas y cancerosas bucales y pueda evaluar la presencia de VPH, ya que éste se considera actualmente como un cofactor de riesgo carcinogénico.

## **X.- CONCLUSIONES**

En la población estudiada de pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal, el VPH se encontró en el 42%, el 66.6% de éstos fueron VPH-16, el 33.4% restante fue negativo para otro tipo de VPH y no se encontró VPH-18.

El consumo de tabaco y alcohol en los casos VPH(+) y VPH(-) presentaron porcentajes similares, el promedio de duración de los hábitos en ambos grupos fue 30 años.

Los casos VPH(+) y VPH(-) mostraron mala higiene bucal y no hubo diferencias.

Los datos obtenidos permiten suponer una probable relación entre el VPH y el carcinoma epidermoide bucal.

## **XI.- RECOMENDACIONES**

Las muestras positivas para virus de papiloma humano por PCR, deberán ser analizadas morfológicamente, observando así los cambios que sufren la células tumorales del carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.

La aportación del presente trabajo será: que se considere al VPH como un cofactor de riesgo en el carcinoma epidermoide de la mucosa bucal y relacionado con los hábitos de tabaco y alcohol, puede ser un factor de mayor potencial a desencadenar una neoplasia maligna.

## **XII.- PROPUESTAS DE INVESTIGACIÓN**

Aumentar el tamaño de la muestra y estudiar otros sitios como orofaringe. Además, de hacer un estudio multicéntrico en donde se pueda evaluar VPH en pacientes con lesiones premalignas y mucosa bucal normal.

Pacientes con presencia de VPH y cáncer de cabeza y cuello debe evaluarse la respuesta al tratamiento y pronóstico.

## REFERENCIAS

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-9.
2. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimate of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002; 87: 72-81.
3. Ord RA, Blanchaert RH. Oral Cancer: the dentist role in diagnosis, management, rehabilitation, and prevention. *Epidemiology of oral cancer*. Quintessence Publishing. Carol Stream, Illinois 2000: 3-8.
4. Mohar AB, Frías MM, Suchil BL. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública México* 1997; 39: 253-8.
5. Estadísticas vitales. Capítulo de mortalidad. SSA/ DGEI.1996.
6. Secretaría de Salud. Epidemiología-Compendio de Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1999; 23-54.
7. Frías MM, Zeichner GI, SÚchil BL. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 1997; 43: 80-5.
8. Sapp JP. Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea. Ed. Madrid 1997: 156-95.
9. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincot. 1997.
10. Schothenfeld DS, Fraumeni JF. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed. Nueva York: Oxford University Press. 1997: 666-80.

11. Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 1994; 21: 281-8.
12. Ogden GR, Wight AJ. A etiology of oral cancer: Alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36: 247-50.
13. Mashberg A, Bofetta P, Winkelman R. Tobacco smoking, alcohol drinking and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993; 72: 1369-75.
14. Abdelsayed R. Study of human papillomavirus in oral epithelial dysplasia and epidermoid carcinoma in the absence or tabacco and alcohol use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 730-2.
15. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254: 1167-73.
16. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 64. Human Papillomaviruses. International Agency of Research on Cancer. 1995.
17. zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 55-78.
18. Carr J. Human papillomavirus. *Clinics in laboratory medicine* 2000; 20: 235-257.
19. De Villiers EM. Human pathogenic papillomaviurs types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 1-12.
20. Wong DT, Munger K. Asociation of human papillomavirus with a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 675-7.
21. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 690-8.

22. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956; 63: 1245-61.
23. Fornatora M, Jones C, Kerpel S. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 82: 47-56.
24. De Villiers M, Weidauer, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985; 36: 575-8.
25. Chang K, Chang Ch, Lai K. High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan. *J Med Virol* 1989; 28: 57-61.
26. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Brit J Vener Dis* 1971; 47: 1-13.
27. Andersson EA, Dillner J, Hagmar B. No serological evidence for non-sexual spread of VPH 16. *Lancet* 1994; 344: 1435.
28. Rylander E, Ruusuvaara L, Almstromer MW. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in women who have not experienced sexual intercourse. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 735-7.
29. Rosenfeld WD, Vermund SH, Wentz SJ. High prevalence rate of human papillomavirus infection and association with abnormal Papanicolaou smears in sexually active adolescents. *Am J Dis Child* 1989; 143: 1443-7.
30. Moscicki AB, Palefsky J, Gonzalez J. Human papillomavirus infection in sexually active adolescent females: prevalence and risk factors. *Pediatr Res* 1990; 28: 507-13.
31. Kashima HK, Shah F, Lyles A. A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 1992; 102: 9-13.

32. Euvard S, Chardonnet Y, Pouteil-Noble C. Association of skin malignancies with various and multiple carcinogenic and non-carcinogenic human papillomaviruses in renal transplant recipients. *Cancer* 1993; 72: 2198-206.
33. Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. Carbon dioxide laser energy disperses human papillomavirus deoxyribonucleic acid onto treatment fields. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1271-4.
34. Schwartz S, Daling J, Doody D. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 626-36.
35. Mineta H, Ogino T, Amano HM. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 4765-8.
36. Mork J, Lie K, Glatre E. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125-31.
37. Brown JJ, Qin M. Identification of differentially expressed genes in human papillomavirus type-16 infected oral cancer cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 124: 663-8.
38. Badaracco G, Venuti A, Morello R. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000; 20: 1301-5.
39. Schwartz SR, Yueh B. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: A population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125: 1-9.

40. McKaig G, Baric S, Olshan F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck Surg* 1998; 20: 250-65.
41. Shah KV. Do human papillomavirus infections cause oral cancer?. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1585-6.
42. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4<sup>th</sup> ed.* 2000.
43. Rodríguez DM. *Cirugía Bucal y Maxilofacial.* Masson ed. 2000.
44. Hernández SR, Fernández CC, Bapistal P. *Metodología de la Investigación.* 2º ed. Mc Grawhill 1998: 255-6.
45. Rapley R, Walker JM. *Molecular Biomehtods Handbook. Polymerase Chain Reaction.* Humana Press, Totowa ed. 2000.
46. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Laboratory Press. Cold Spring 1989.
47. Resnick RM, Cornelisseu MTE, Wright DK. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1477-84
48. Gopalakrishnan R, Weghorst CH, Lehman T. Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 83: 471-7.
49. Thing Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomavirus. *PCR Protocols: A guide to methods and application* 1990; 356-66.
50. Van de Brule AJC, Mijerchirs JLM, Bakels V. Rapid detection of human papilloma viruses cervical scrapes by continued general primer mediated and type-specific polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2739-43.

51. Qu W, Jiang G, Cruz Y. PCR Detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primers systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1304-10.
52. Matzow T, Boysen M, Kalantari M. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol* 1998; 37: 73-6.
53. Chen Z, Storthz KA. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. *Cancer Res* 1997; 57: 1614-9.
54. Ong Ch, Chan S. Evolution of human papillomavirus type 18 and ausent phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993; 67: 6424-31.
55. Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol* 1987; 193: 599-608.
56. Berumen J, Casas L, Segura E. Genome amplification of human papillomaviruses types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994; 56: 640-5.
57. Miller S, White K. Human papillomavirus expresion in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 57-68.
58. Paz B, Cook N, Odom-Mayron T. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer* 1997; 79: 595-604.
59. Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.

60. Watts S, Brewer E, Fry T. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 701-7.
61. Maitland NJ, Cox M, Lynas C, Prime S. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987; 56: 245-50.
62. Howell R, Gallant L. Human papillomavirus type 16 in an oral squamous carcinoma and its metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 620-6.
63. Ostrow R, Dawn A, Fong W. A survey of human cancers for human papillomavirus DNA by filter hybridization. *Cancer* 1987; 59: 429-34.
64. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001; 91: 622-35.
65. Shroyer K, Greer R. Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 708-13.

## XIV Anexo



Anexo 1  
**Instituto Nacional de Cancerología**  
SERVICIO DE BUCODENTOMAXILAR  
DEPARTAMENTO DE CABEZA Y CUELLO  
DIVISION DE CIRUGIA  
PROTOCOLO PREVALENCIA VPH EN CANCER BUCAL

**HISTORIA CLINICA BUCAL**

Fecha de Elaboración: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Expediente Núm.:

Nombre del Paciente: \_\_\_\_\_ Sexo:

Edad:	<input type="checkbox"/>	Tipo de Industria en su Trabajo	
Estado Civil:	<input type="checkbox"/>	(Materiles usado en su Trabajo)	
Grado de Escolaridad:	<input type="text"/>	Madera:	<input type="checkbox"/>
Originario:	<input type="text"/>	Asbesto:	<input type="checkbox"/>
Residente:	<input type="checkbox"/>	Papel:	<input type="checkbox"/>
Raza:	<input type="checkbox"/>	Textil:	<input type="checkbox"/>
Idioma y/o dialecto:	<input type="checkbox"/>	Minera:	<input type="checkbox"/>
Ocupación:	<input type="checkbox"/>	Petroquímica:	<input type="checkbox"/>
Clasificación Socioeconómica:	<input type="checkbox"/>	Metalúrgica (especificar):	<input type="text"/>
Karnovsky:	<input type="checkbox"/>	Química (especificar):	<input type="text"/>
Sitio de la Lesión:	<input type="checkbox"/>	Otra (especificar):	<input type="text"/>
Tamaño:	<input type="checkbox"/>	Tiempo de Evolución:	<input type="checkbox"/>

Diagnóstico Oncológico Presuncional:  Diagnóstico Definitivo:

Clasificación Clínica: T  N  M  (especificar sitio):

Etapas Clínicas:

Fecha Biopsia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ In: \_\_\_\_\_ Exp.: \_\_\_\_\_

Pieza Remitida:  Datos Clínicos:  Patología IC:

**LESIONES PREMALIGNAS BUCALES**

Leucoplaquia:  Eritoplaquia:  Papiloma:  Papilomatosis:

Nevo Blanco esponjoso:  Disqueratosis Congénita  Liqueno plano:

Hiperplasia pseudoepiteliomatosa:  Otras lesiones (especificar):

## ANTECEDENTES DE HABITO TABAQUISMO

¿Conoce usted la relación entre el tabaco y el cáncer ?

SI  NO   
 Tabaquismo Positivo   
 Negado

¿A qué edad lo inició?  años

¿A qué edad lo suspendió?  años

¿Por qué lo dejó? Convicción   
 Indicación médica   
 Sentirse mal   
 Otra causa (especificar)

## Forma de Tabaquismo:

Cigarrillo  Con filtro  Sin filtro   
 C. de hoja  Puro  Pipa   
 Inhalado  Mascado

## Tipo de Tabaco:

Rubio  Oscuro  Mixto   
 No sabe  Marihuana

Número promedio consumido por día de:  
 Cigarrillos  Puros  Pipas   
 Aspiraciones  Cubos de mascar

## ANTECEDENTES DE HABITO ALCOHOL

¿Conoce usted las relaciones entre el alcoholismo y el cáncer?

SI  NO

Alcoholismo:

Positivo  Negado

¿A qué edad inicio?  años

Frecuencia de ingesta de alcohol:

Diario  
 Cada semana  
 Casa 15 días  
 Cada mes  
 Ocasional. **Especificar:**

Tipo de alcohol:

Pulque   
 Alcohol   
 Aguardiente   
 Mezcal   
 Tequila   
 Ron   
 Brandy   
 Whisky   
 Cognac   
 Cerveza   
 Otros **Especificar:**

Cantidad promedio por día:

Copas   
 ml   
 Cervezas   
 ¿A qué edad dejó de tomar?  años

¿Por qué dejó de tomar?:

Convicción   
 Indicación médica   
 Sentirse mal   
 Otras causas. **Especificar:**

## ANTECEDENTES DE HIGIENE ORAL.

¿Se lava la boca SI  NO

¿Cada cuándo lava su boca?

¿Le sangran las encías al cepillarse los dientes?

¿Desde qué edad?:

¿Con qué se limpia la boca?

Chicle   
 Palillos   
 Colutorios

Agua simple

Cepillo dental

Pasta dental

Hilo dental

Otros especificar:

Veces al día SI  NO

Veces a la semana

Veces al mes

Ocasional

Agua con sal

Agua con bicarbonato

Antisépticos especificar

¿Tiene dolor de boca al lavarse?

SI  NO

¿A visitado alguna vez al dentista?

¿Cuántas veces aproximadamente?

SI  NO

Tipo de Dentista

Privado

Institucional

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### ANTECEDENTES PERSONALES

¿Hay antecedentes de cáncer de cabeza y cuello en su familia consanguínea? SI  NO

¿Quién (es) lo padecieron? *especificar:*

¿Es usted alérgico? SI  NO

¿Es usted alérgico? SI  NO

¿Es usted epiléptico? SI  NO

¿Ha tomado o está tomando? SI  NO

¿Alguna vez ha tenido hepatitis viral?

SI

NO

¿Ha tenido trastornos nerviosos mentales?

SI

NO

¿Ha tenido trastornos cardiovasculares?

SI

NO

### OTROS FACTORES

Úlceras

Estomatitis

Parodontitis\_Infecciones agregadas

Mucositis

Candidiasis

Movilidad Dentaria

Xerostomía

Anemias

Sifilis

Herpes simples – Zoster

VPH - Tipo \_\_\_\_\_

Dentaduras mal adaptadas

Problemas de ATM

Trauma

Stress

Otros

RX ortopantomografía

TAC dental

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Anexo 2

Carta de consentimiento informado del protocolo de prevalencia del virus de papiloma humano en cáncer bucal.

México D.F. \_\_\_\_\_

El suscrito: \_\_\_\_\_

autoriza al personal médico del Servicio Bucodentomaxilar del Depto de Cabeza y Cuello del INCan el ser incluido en este estudio clínico; el cual consiste en contestar un cuestionario y en dar una parte de su biopsia, que básicamente se utiliza para el dx. de mi enfermedad, para determinar la presencia del virus del papiloma humano.

Toda la información del cuestionario es estrictamente confidencial y en ningún reporte aparecerán mi nombre o dato que me identifique.

El responsable del trabajo es la Dra. Blanca R. Ibieta Zarco \_\_\_\_\_ a quien puedo contactar al tel. 56280400 ext. 282 para que en caso de dudas, me las aclare.

La firma en esta carta no interviene, ni modifica en ningún momento mi tratamiento y en caso de no participar en el estudio, no se verá afectado el tratamiento.

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

### Anexo 3

#### Escala de Karnofsky

*Capacidad para realizar cualquier actividad en forma normal, no requiere cuidado especial.*

- 100 Normal; ninguna molestia sin evidencia de enfermedad
- 90 Capaz de realizar actividad normal; signos y síntomas menores de enfermedad.
- 80 Actividad normal, con esfuerzo; algunos signos y síntomas de enfermedad.

*Incapacidad para trabajar; capacidad para vivir en el hogar; puede cuidar de su persona; requiere en ocasiones de asistencia.*

- 70 Se vale por sí mismo; capaz para realizar actividad normal o hacer trabajo activo
- 60 Requiere asistencia ocasional, pero es capaz de cubrir sus necesidades por sí mismo.
- 50 Requiere considerable asistencia y cuidados médicos frecuentes.

*Incapacidad para valerse por sí mismo, requiere cuidados hospitalarios o institucionales; la enfermedad progresa rápidamente.*

- 40 Incapacitado; requiere cuidados y asistencia especial
- 30 Intensamente incapacitado; la hospitalización está indicada aun cuando la muerte no sea inminente.
- 20 Muy enfermo; la hospitalización es necesaria
- 10 Moribundo; el proceso es mortal y progresa rápidamente
- 0 Muerto

## MATERIAL

Área Clínica: Servicio Bucodentomaxilar, Departamento Cabeza y Cuello, Consulta Externa: sillón de exploración, lámpara, braket, autoclave, guantes, cubre bocas, campos estériles, espejo bucal # 5, pinzas de curación, pinzas de disección, pinzas de mosco, tijeras de encía, pinza puch, bisturí convencional #15 y #11, sutura catgut # 3 ceros, frasco para contener el formol, anestesia (xilocaína con epinefrina, prilocaína con fenilpresina), agujas para anestesiar (corta, larga), jeringa para anestesiar carpulle, tubos de Eppendorff.

Área de Investigación Básica: en el laboratorio se realizó la técnica de PCR, mesas e instrumental de laboratorio: cámara de flujo laminar, tubos de Eppendorff, puntas 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 500 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L, pipetas (marca Gilson) fueron ocupadas para extracción de ADN, producto y líneas celulares. Termocicladores, thermomixer, centrifuga picofuga de 12,000 rpm x minuto y centrifuga de 15,000 rpm x minuto, vórtex, cámara de electroforesis (grande y chica), fuente de poder, espectrofotómetro, aparato transiluminador de luz ultravioleta, película fotográfica instantánea blanco y negro Polaroid 3 1/4 x 4 1/4, cámara fotográfica Kodak, cuarto oscuro.

Reactivos para digestión con proteinasa K, reactivos para extracción de ADN, reactivos para el gel de agarosa, reactivos para amplificación de  $\beta$ -globina, reactivos para amplificación de VPH por PCR, reactivos para amplificación de VPH-16 y VPH-18.

### Buffer de Lisis

Los componentes utilizados para la preparación del Buffer de lisis fueron: 10mM TRIS-Cl (pH8.0), 0.1 M EDTA (pH8.0), 10-20  $\mu\text{g/ml}$  RNAsa, 0.5% SDS este compuesto es el medio adecuado para mantener al tejido en condiciones óptimas, que al colocar la enzima proteinasa K, ésta pueda desempeñar su función rompiendo la membrana de la estructura de la célula; eliminando así proteínas y lípidos.

### Amplificación por un gen conservado de $\beta$ -globina por PCR

Amplificación de  $\beta$ -Globina 20  $\mu\text{l}$  = 10  $\mu\text{l}$  muestra + 10  $\mu\text{l}$  reacción

	$\mu\text{l}$	
Buffer	2	↓
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.6	8 $\mu\text{l}$ muestra +2 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O estéril
dNTPs	2	
PCO4	.2	x # reacciones
GH <sub>2</sub> O	.2	
T.Gold /Amplitaq	.13	
H <sub>2</sub> O esteril	3.87	( 268 pb)

### Gel de Agarosa

Se efectuó la preparación del gel de agarosa es un polímero lineal extraído de alga marina; se mezclaron 2gr de agarosa al 2% en 100 $\mu\text{L}$  de Buffer TBIX, se agregó bromuro de etidio y se dejó gelificar.

La amplificación de PCR para la detección de VPH se llevó a cabo para cada una de las muestras con los siguientes oligo-primers:

**Amplificación de PCR para VPH – primers universales MY09/MY11(450 pb)**

	$\mu$ l	
10 x PCR buffer	2	20 $\mu$ L = 10 $\mu$ l muestra +10 $\mu$ l reacción
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.6	
DNTPs	2	
MY09	.2	x # reacciones
MY11	.2	
T.Q	.15	
H <sub>2</sub> O esteril	3.85	

**Amplificación de PCR para VPH – primers universales GP5/GP6 (150 pb)**

	$\mu$ l	
10 x PCR buffer	2	20 $\mu$ L = 10 $\mu$ l muestra +10 $\mu$ l reacción
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.6	
DNTPs	2	
GP5	.2	x # reacciones
GP6	.2	
T.Q	.15	
H <sub>2</sub> O esteril	3.85	

La amplificación por PCR para identificar subtipos de VPH con los siguientes oligo-primers:

Amplificación de PCR para VPH-16 con primers específicos E6-HZ27/HZ28 (480 pb)

10 × PCR Buffer	2	20 $\mu$ l = 10 $\mu$ l muestra + 10 $\mu$ l reacción
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.6	
dNTPs	2	× # reacciones
E6HZ27	.2	
E6HZ28	.2	
T.Q	.15	
H <sub>2</sub> O esteril	3.85	

La amplificación por PCR para identificar subtipos de VPH con los siguientes oligo-primers

Amplificación de PCR para VPH-18 con primers específicos LCR18a/b (350 pb)

10 × PCR Buffer	2	20 $\mu$ l = 10 $\mu$ l muestra + 10 $\mu$ l reacción
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	1.6	
dNTPs	2	× # reacciones
LCR18a	.2	
LCR18b	.2	
T.Q	.15	
H <sub>2</sub> O esteril	3.85	

Las temperaturas utilizadas en el termociclador para los siguientes oligo-primers.

Estas temperaturas fueron las utilizadas de acuerdo al tipo de amplificación que se requería, para amplificación de  $\beta$ -globina y para amplificación de VPH y subtipos por PCR.

	Primers	Tamaño	Temperatura	Lineas celulares
Región L1	MY09/MY11	480 pb	55°C	Caski o Hela
	GP5/GP6	250 pb	55°C	
	L1C1/L1C2	150 pb	48°C	
VPH 16	E6 E7	790 pb	58°C	Caski
	E6 HZ27/HZ28	480 pb	58°C	
	LCR16 a/b	450 pb	55°C	
VPH18	LCR18 a/b	350 pb	55°C	Hela

TESIS CON  
FALLA DE CATEGORÍA

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## Reactivos de PCR

Los componentes de la técnica de reacción de polimerasa en cadena son: 10 PCR x Buffer KC1 50mM, Tris-HCl 10mM, SDS ayudan a mantener un pH 8.3 medio adecuado para que se realice la reacción.

La concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$  2mM) sirve para que las bandas se alineen, tengan nitidez y sean únicas.

La síntesis dNTPs del ADN donde los oligo-primers detectan con mayor exactitud la región que se quiere amplificar.

Taq polimerasa es una enzima que ayuda a amplificar el ADN, extiende las secuencias específicas a cada uno de los oligo-primers. Esta enzima se extrae de una bacteria llamada *Thermus Aquaticus*, que habita en lugares calientes como el Parque Nacional Yellowstone en EE.UU.

La cuantificación de las muestras en el estudio se realizaron con siguiente la fórmula:

$$\frac{\text{D.O. (260)} \times \text{factor de dilución} \times 50}{1000\mu\text{L}} = \text{ng}/\mu\text{L}$$

\* La fórmula proviene de que  $D.O_{260} = 1 = 50\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN

FALLA DE ORIGEN

## **CURRICULUM VITAE**

### **DATOS PERSONALES**

**Nombre:** Blanca Rosa Ibieta Zarco  
**Lugar de Nacimiento:** México, D.F.  
**Dirección:** Agapando No.88  
Col. Jardines de Coyoacán  
C.P. 04890  
México, D.F.  
**Teléfono:** 56-84-85-07  
**E – mail:** ibieta2000@hotmail.com  
**RFC:** IIZB-521010-CK6

### **ESTUDIOS PROFESIONALES**

**Marzo 2002 – a la fecha.** DOCTORADO  
En proceso de Titulación  
División de Estudios de Postgrado e  
Investigación. Facultad de Odontología.  
U.N.A.M. México, D.F.

**1978 - 1979** MAESTRIA  
División de Estudios de Postgrado de  
la Facultad de Odontología  
(Odontopediatria).  
U.N.A.M. México, D.F.

**1972 -1975** LICENCIATURA  
Cirujano Dentista  
Facultad de Odontología  
U.N.A.M. México, D.F.

## **CURSOS Y CONGRESOS**

**Noviembre 2002**

Asistencia al curso de Cabeza y Cuello "Nuevas tendencias en el manejo de cáncer de laringe", llevado a cabo en el INCan, México, D.F.

**Noviembre 2002**

Ponencia / Asistencia en la 1ra Reunión de Estomatología Hospitalaria, con el tema "Manejo del paciente Oncológico con Diabetes Mellitus y Rehabilitación Protésica", llevado a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. "Salvador Zubirán". México, D.F.

**Octubre 2002**

Ponencia "Cáncer bucal y complicaciones por tratamientos" dirigida a alumnos de la Universidad Tecnológica de México (UNITEC), llevado a cabo en el INCan, México, D.F.

**Octubre 2002**

Asistencia al VI Encuentro Internacional de la Sociedad Latinoamericana de Rehabilitación de la Cara y Prótesis Bucodentomaxilar, llevado a cabo en el INCan, México, D.F.

**Julio 2002**

Ponencia en el curso de capacitación para Nuevas Integrantes del Grupo RETO, con el tema Cuidados Estomatológicos, llevado a cabo en el INCan, México, D.F.

**Febrero 2002**

Ponencia / Asistencia a la XIX Reunión Nacional Médica de Cancerología de México, con el tema "Prevalencia del Virus de Papiloma Humano (VPH) en el cáncer bucal" llevado a cabo en la Cd. de Villahermosa, Tabasco.

## **SOCIEDADES A LA QUE PERTENECE**

**Junio 2002**

**Asociación Mexicana de Estomatología  
Hospitalaria A.C., (AMEH). México, D.F.**

**1981 a la fecha**

**Sociedad Médica del Instituto Nacional  
de Cancerología, México, D.F.**

## **EXPERIENCIA LABORAL**

**1981 a la fecha**

**Instituto Nacional de Cancerología  
Servicio Bucodentomaxilar  
Depto. Cabeza y Cuello, Div. Cirugía  
Función: Atención Clínica Odontológica**

**México D.F.  
San Fernando N° 22  
Col. Tlalpan, C.P. 14000  
Tel. 56280400 Ext. 282**