



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE VÍAS
AERODIGESTIVAS SUPERIORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

CD. ISABEL MARTÍNEZ SANABRIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO D.F.

MAYO, 2009



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.

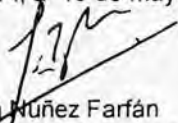
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de marzo 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MARTÍNEZ SANABRIA ISABEL** con número de cuenta **98535350** con la tesis titulada "**DETERMINACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES**", realizada bajo la dirección del **DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**:

Presidente: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
Suplente: DR. VICENTE MADRID MARINA
Suplente: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de mayo de 2009.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

APOYOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
Instituto Mexicano del Seguro Social. (IMSS)

AGRADECIMIENTOS

♦ Al Comité Académico del Posgrado en Ciencias
Biológicas (Biología Experimental)
Entidad Facultad de Medicina

♦ Un agradecimiento especial a la
Dra. Yolanda López Vidal

♦ Coordinación del Posgrado en Ciencias
Biológicas (Biología Experimental)

♦ Un sincero agradecimiento a los miembros de mi comité
tutoral;

Dr. Alfonso Dueñas González

Dra. Marcela Lizano Soberón

Por su valiosa orientación en el desarrollo de mi
trabajo, así como por el apoyo académico que siempre
me brindaron.

♦

* Agradezco especialmente a mi tutor y miembro del comité;

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Por el gran apoyo recibido a cada momento a lo largo de mi trayectoria como estudiante de maestría, gracias por todo el aprendizaje recibido y por la asesoría en el desarrollo de éste trabajo ya que sin su ayuda no habría sido posible llevarlo a cabo.

Sinceramente...gracias

Gracias a Dios por todas sus bendiciones, gracias por
llevarme en hombros cuando no he podido caminar...

* Agradezco infinitamente a mis padres que han sido mi
ejemplo a seguir, mi soporte en los momentos
difíciles y
mis mejores amigos.
Gracias por su amor incondicional, por la fuerza que me
brindan siempre
y porque siempre tienen una mano extendida para ayudarme a
continuar por mi sendero, gracias..

- Agradezco a mis hermanos porque siempre están cuando los necesito, gracias por compartir conmigo triunfos y fracasos.

• Gracias a
a mis familiares y amigos, que siempre tienen una palabra de
aliento y que me han demostrado su cariño y apoyo.

★ Gracias a ti,
que me has dado la fuerza para seguir adelante,

Te dedico éste trabajo a ti que eres mi luz y la mayor
bendición en mi vida.....a mi pequeña Isabel Cristina

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN

1.-Virus de Papiloma Humano.....	3
2..Carcinogénesis.....	6
3.- Carcinoma de Vías aerodigestivas superiores (VADS).....	8
4.-Neoplasias epiteliales malignas de mucosa bucal.....	9
5.-Epidemiología de cancer de vías aerodigestivas superiores.....	19
6.-VPH y Carcinoma de células escamosas de vías aerodigestivas superiores.....	21

II.JUSTIFICACIÓN.....23

III.-HIPÓTESIS.....24

IV.-OBJETIVO.....25

V.-MATERIALES Y MÉTODOS.....25

1.-Tejidos y

muestras.....25

2.-Extracción y purificación del DNA genómico.....26

3.-Detección de VPH en muestras de Ca. bucal.....27

VI.-RESULTADOS

1.-Detección de secuencias de VPH.....29

2.-Correlación de datos clínicos e infecciónVPH.....29

VII.- DISCUSIÓN.....	40
VIII.-CONCLUSIONES.....	44
IX.-REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	5
Figura 2.....	13
Figura 3.....	28
Figura 4 ^a	29
Figura 4b.....	30
Figura 5.....	30
Gráfico 1.....	31
Gráfico 2.....	33
Gráfico 3.....	34
Tabla1.....	13
Tabla2.....	16
Tabla3.....	18
Tabla4.....	29
Tabla5.....	31
Tabla6.....	32
Tabla7.....	34
Tabla8.....	35
Tabla9.....	36
Tabla10.....	36
Tabla11.....	36
Tabla12.....	37

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Virus Papiloma Humano

Los virus VPH son agentes patógenos que infectan los queratinocitos de diversos tejidos epiteliales, entre ellos el epitelio del tracto aerodigestivo superior y mucosa bucal. Existe una clara asociación entre los virus de papiloma humano y el desarrollo de lesiones neoplásicas en tejidos humanos. En lesiones bucales benignas y malignas se han identificado varios tipos del virus del papiloma humano (VPH).^(21,22,25,26). Se considera que los virus infectan las células de manera persistente y residen en ellas de forma latente con niveles de carga viral muy baja durante largos períodos de tiempo. De los VPH se han encontrado fundamentalmente el tipo 16 y 18 responsables de las lesiones malignas como el carcinoma de células escamosas de vías aerodigestivas superiores (VADS)^{(14,36,38,46,48)jk}

Estudios realizados previamente han demostrado el potencial del VPH como agente infeccioso carcinogénico en éstos carcinomas. En las células del epitelio los queratinocitos sufren inmortalización y transformación por el virus debido a que el gen E6 del VPH interactúa con el gen p53 de la célula hospedera. Los VPH infectan el tejido, replicándose en su interior e induciendo su proliferación, los procesos intracelulares que dan por resultado la transformación de las células por acción de dichos virus oncogénicos se relacionan con el genoma viral incorporado a una región parcialmente homóloga del genoma celular en donde permanece como profago.^(22,24) Los cromosomas de las células tienen sitios de posible integración. Los oncogenes E6 y E7 virales interactúan de manera que sus proteínas inactivan la proteína

p53 y el producto del gen retinoblastoma respectivamente, lo cual es causa fundamental del desarrollo de la carcinogénesis. (25,26,)

Los VPH no poseen envoltura, se replican específicamente en el núcleo de las células epiteliales escamosas. Son viriones epiteliotrópicos su genoma mide aprox. 8 kilobases de longitud, con un peso molecular de 5×10^6 daltons, icosaédrico no encapsulado con un diámetro de 50nm; las partículas virales están compuestas por una cápside proteica conformada en un 95% por la proteína L1 y en un 5% de la proteína L2, las cuales se ensamblan para formar los 72 capsómeros del tejido.

Las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares por lo cual no se clasifican por serotipos, por tanto los VPH se clasifican en genotipos y subtipo basado en las diferencias a nivel de secuencia de DNA. La expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones. Los VPH no presentan una fase lítica por lo tanto se valen de las características propias de las células que las albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato sufren un proceso de descamación. (5,6,7,62,66)

Hacia el interior de la cápside se encuentra el DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8500 pb constituido por 8 genes y una región regulatoria codificante, la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación. Las regiones de DNA de los VPH que codifican proteínas virales están localizadas en una cadena plus que se subdivide en una región

temprana y en la región tardía anteriormente mencionada; los genes que son codificados en etapas tempranas de la infección conocidos como E(early)son seis; E1, E2, E3, E4, E6 E7 (aunque se considera que E4 en realidad es un gen tardío , ya que la secuencia de éste gen está totalmente contenida dentro de la secuencia del gen E2 pero en un marco de lectura diferente) (ver Figura 1). (25,41,75) Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. La región de control posee sitios de unión para elementos reguladores del ciclo replicativo viral.

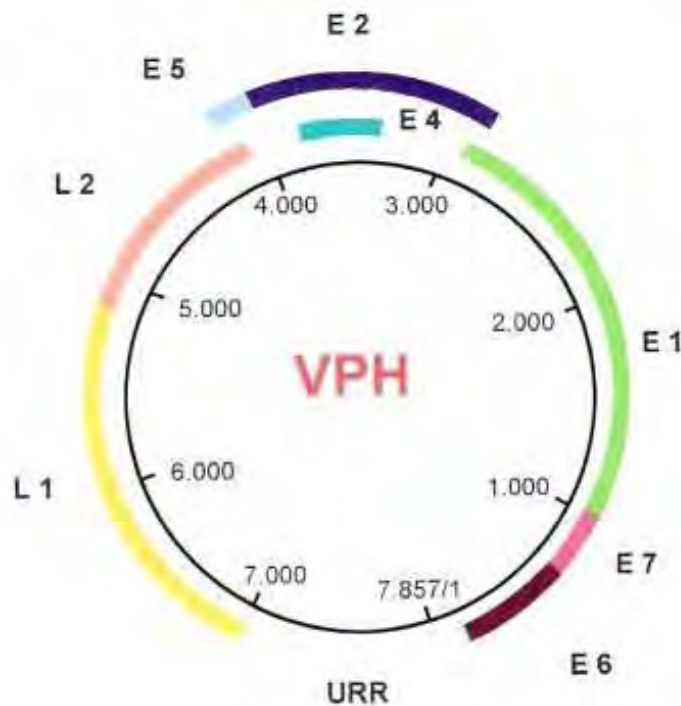


Figura 1.- Genoma de VPH. Se muestra el genoma episomal donde E corresponde a los genes (E1-E7) que se expresan tempranamente (Early); L, corresponde a los genes estructurales de expresión tardía (Late). URR o LCR corresponde a la región promotora de control la expresión (Región Larca de Control).

El ciclo replicativo viral está ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales infectadas. El virus se une a la célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula alfa 6 integrina, y se establece dentro del núcleo, de ésta forma inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas

de las capas basales del epitelio. El DNA viral permanece en estado episomal fuera de los cromosomas de la célula hospedera, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular e inicia la transcripción de sus genes cuando

las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio. La replicación viral se estimula produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones microheridas y abrasiones.(24, 26,28)

2.-Carcinogenesis

El cáncer es una proliferación acelerada, desordenada y descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen localmente los tejidos. Los factores que intervienen en su desarrollo son tan numerosos como los tipos de cáncer y evolución. Las neoplasias se inician con una única célula mutada genéticamente que empieza a crecer de forma descontrolada. (10,11,12,62, 64)

El cáncer es también un proceso multifactorial y con múltiples etapas. Los protooncogenes, antioncogenes y virus oncogénicos están involucrados en el desarrollo de diversas neoplasias. Los genes p53 y y RB codifican dos proteínas antioncogénicas que regulan las decisiones celulares de proliferación o diferenciación. Los VPH están implicados en su etiología como iniciadores de proliferación celular debido a que infectan el tejido mucoso replicándose en su interior e induciendo los procesos intracelulares que dan por resultado la transformación de las células. (62) En los casos en los cuales se integra el DNA viral al DNA de la célula hospedera el patrón de integración es clonal lo cual indica que la asociación del VPH precede al crecimiento de la neoplasia. De esta manera encontramos que el DNA viral se detecta de un 70-90% en las neoplasias malignas. (50,53,62,64)

La inactivación de proteínas oncogénicas p53 y p105RB por parte de los oncogenes virales E6 y E7 respectivamente mantienen el estado de división celular continua, ésto es la causa fundamental del desarrollo de la carcinogénesis.

El papel de estos genes celulares y sus productos es la de regulación del ciclo celular y control de la transcripción celular. El retinoblastoma (RB) está localizado en el cromosoma 13 y su producto es la proteína pRB (105KDa) que

interactúa con el factor de transcripción E2f de la fase del ciclo G1 del ciclo celular. Ésta interacción inhibe el factor induciendo la transcripción de genes propiciando la proliferación celular. (24,25,23,32)

El gen p53 es un gen localizado en el cromosoma 13, sus productos proteicos regulan la supresión de la transcripción celular, siendo una proteína depresora del crecimiento celular.

E1 es requerida para la replicación del virus, la inactivación de E1 ORF por mutagénesis da como resultado la integración del DNA viral dentro del cromosoma hospedero con la concomitante pérdida de la forma episomal del DNA del VPH.

Existen dos funciones principales de replicación para E1, la primera inicia un modulador E1-M, la segunda por una secuencia de codificación cuya función está dada en la replicación viral E1-R. El gen E2 produce una proteína que es requerida por el virus para su replicación en conjunto con la proteína E1. La proteína E2 reconoce y se ancla en las cadenas de secuencias en las que se origina la replicación de muchos papilomavirus. E4 se asocia con citoqueratinas, lo cual puede ser de importancia en la determinación de la especificidad del tejido o de los diferentes tipos virales.(18, 20,24) La expresión de la proteína E5 activa el receptor endógeno celular para el factor de crecimiento formando un complejo entre E5 y el receptor. Esto después transmite la señal de transformación proliferativa celular.(18)

3.- Carcinoma de Vías aerodigestivas superiores (VADS)

El cáncer de cabeza y cuello se desarrolla en una variedad de tejidos comprendidos entre la base del cráneo superiormente y el orificio superior del tórax, comprende órganos y espacios; tracto respiratorio y digestivo superior. Ésta unidad anatómica y funcional es denominada vías aerodigestivas superiores (VADS). El tracto digestivo comprende cavidad bucal, orofaringe, hipofaringe, esfínter esofágico, esófago cervical, conductos excretores de glándulas salivales y oído medio. El tracto respiratorio contempla nasofaringe, senos paranasales, fosas nasales, laringe y tráquea. (46,76)

Aproximadamente el 85 % del cáncer de cabeza y cuello se originan en la mucosa de VADS, la etiología asociada en la mayoría de los casos es el tabaquismo en 90% en los hombres y 60% mujeres como factor principal de desarrollo neoplásico. El consumo de alcohol es la segunda causa de cancer de VADS, se relaciona con el desarrollo de carcinoma escamoso bucal, hipofaringe, orofaringe, laringe supraglótica. También se asocia al uso de tabaco mascado, pobre higiene bucal, algunos riesgos ocupacionales o profesionales. (46,76)

La infección por VPH se ha estudiado como cofactor en el desarrollo de los carcinomas, debido al epiteliotropismo que posee. (50,53)

4- Neoplasias epiteliales malignas de mucosa bucal

La mucosa bucal consta de epitelio plano estratificado y tejido fibroconectivo vascularizado de sostén también llamado lámina propia. En paladar y encía la mucosa se encuentra directamente sobre hueso y se denomina mucoperiostio, en general en éstas áreas muestra queratinización (mucosa masticatoria). El resto de las localizaciones intrabucales contienen submucosa donde puede haber grasa y o glándulas salivales menores, por lo regular el epitelio no está queratinizado.

Leucoplasia bucal; (OMS 1978) Placa blanca que no se desprende por raspado y no es posible calificarla como ninguna otra enfermedad. Se clasifica en homogénea y no homogénea. (32,62,)

-Displasia epitelial-neoplasia intraepitelial bucal NIE-B

Las primeras transformaciones malignas que sufren el epitelio son a nivel celular. Estos cambios citológicos sugieren que el desarrollo del epitelio es anormal y el proceso es interpretado como neoplasia intraepitelial bucal NIE-B. Estas alteraciones referidas como displasia epitelial se dividen en lesiones de bajo grado y de alto grado y se relacionan con la evolución y el curso de la enfermedad. Las características son las siguientes; (

- Pérdida de polaridad de las células basales
- Presencia de más de una capa de células de aspecto basaloide.
- Estratificación celular epitelial irregular(pérdida de polaridad)
- Pérdida de la relación núcleo-citoplasma
- Aumento del número de mitosis en los diferentes estratos.
- Pleomorfismo celular

- Hiperchromatiasia nuclear
- Agrandamiento nuclear
- Queratinización de células individuales o en grupos de estrato espinoso
- Reducción de la cohesión celular

De acuerdo con la severidad, espesor y extensión de éstas alteraciones se clasifican como de bajo y alto grado, si afecta menos o más de 30% del espesor epitelial respectivamente.

--Carcinoma microinvasor y carcinoma de extensión superficial.

Las neoplasias intraepiteliales de la mucosa bucal tienen la capacidad de progresar hasta neoplasias invasoras, algunas publicaciones calculan que ocurre en 4% de los casos. El período de evolución varía de meses a años. Desde el punto de vista patológico el carcinoma invasor temprano describe una lesión neoplásica mínimamente invasora a la lámina propia. El carcinoma invasor temprano es siempre una lesión superficial en términos de patología; puede ser extenso en sentido horizontal no invade musculatura o cartílago adyacente pero es capaz de dar metástasis.⁽³²⁾

El carcinoma invasor se caracteriza por atravesar membrana basal e invadir estroma subyacente donde puede penetrar vasos linfáticos y sanguíneos para causar más tarde metástasis linfática y/o metástasis a distancia.

Las lesiones de los carcinomas intraepitelial, microinvasor, de extensión superficial, invasor profundo, multicéntrico y otros pueden coexistir en una pieza quirúrgica; el pronóstico dependerá del tumor que muestre mayor grado de infiltración. Así los carcinomas microinvasor y de extensión superficial son carcinomas tempranos. ^(46,48,62)

-Carcinoma invasor

Debido a que la mayor cantidad de epitelio de revestimiento de la mucosa bucal es plano estratificado, más de 90% de todas las neoplasias malignas son carcinomas epidermoides. La apariencia del carcinoma puede variar desde una placa blanca (leucoplasia) o roja (eritroplasia) a una masa grande, fungante, ulcerada o indurada.

Mashberg y Meyers han enfatizado que los carcinomas tempranos de cavidad bucal ocurren en piso de boca, lengua (bordes laterales), paladar blando.

La mayoría de los tumores pueden someterse a biopsia bajo anestesia local y obtener así suficiente tejido para su diagnóstico y posterior manejo de acuerdo con la etapa clínica. La realización de biopsia incisional o de punch suele ser suficiente para el diagnóstico preciso, la biopsia excisional se practicará cuando el cirujano lo considere como un tratamiento adecuado dejando márgenes mayores a 1 cm.

El espécimen será enviado al patólogo con la referencia de los márgenes de resección, para ello la biopsia será orientada anatómicamente por medio del material de sutura. (20,32,46)

-Aspectos histopatológicos

El cancer de VADS corresponde en un 95% al tipo histológico de células escamosas, puede variar desde bien diferenciado a pobremente diferenciado. Fue originalmente propuesto por Broders (Tabla 1) y está basado de acuerdo con el parecido que las células neoplásicas guardan con el epitelio de origen. Así, el tejido neoplásico que guarda mayor parecido al epitelio normal se conoce como carcinoma epidermoide bien diferenciado.(59,60) En éste se reconocen puentes intercelulares y formación de perlas de queratina. Por el

contrario, los carcinomas pobremente diferenciados sólo muestran focos ocasionales de queratinización o en células individuales y con ocasionales puentes intercelulares. El carcinoma indiferenciado es aquél que muestra organización arquitectural o citológica de origen epitelial y en la mayoría de los casos sólo confirmada por estudio de inmunohistoquímica con citoqueratinas (Ver figura 2). Existen también variantes histológicas del carcinoma de células escamosas; **-Carcinoma verrucoso, carcinoma de células fusiformes, carcinoma epidermoide de patrón basaloide y de tipo adenoescamoso.**^(46,48)

La mayoría de las neoplasias malignas de VADS corresponden a carcinomas epidermoides, con diferentes grados de diferenciación histológica. (Ver tabla 1) Su diversidad histológica y comportamiento biológico los hace distintos desde el punto de vista epidemiológico y terapéutico. ^(58,59)

TABLA1.- CLASIFICACIÓN DE BRODERS

	I	➤ el 25% de las células de la neoplasia maligna están indiferenciadas.
Grado	II	➤ el 50% de las células de la neoplasia maligna están indiferenciadas.
Grado	III	➤ : el 75% o más de las células de la neoplasia maligna están indiferenciadas.

Sistema de Broders para dictaminar e grado histológico de diferenciación de carcinomas de células escamosas. Está basado de acuerdo al parecido que las células neoplásicas guardan con el epitelio de origen^(58,59,60,61,62)

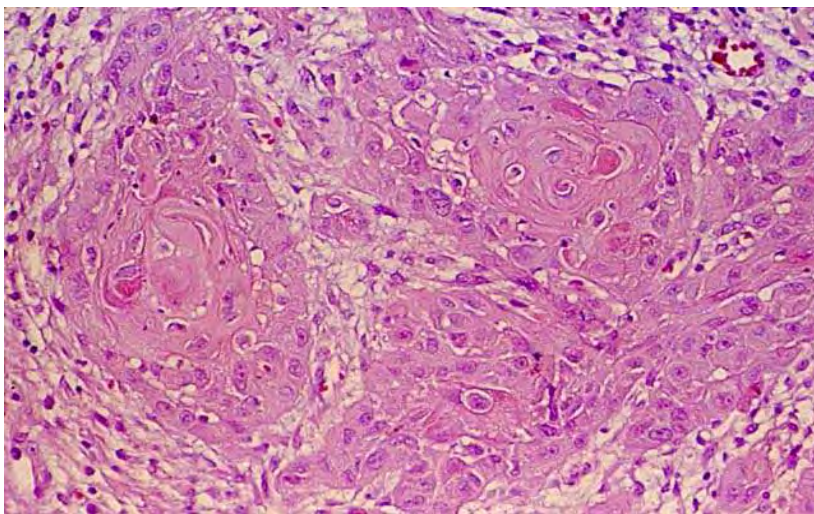


Figura 2.- Corte en laminilla que muestra la histopatología de un carcinoma epidermoide de lengua tipo histológico indiferenciado invasivo (Shah Jatin et al. Oral Cancer 2003)

Para evaluar la conducta biológica de éstas neoplasias se recomienda dividir las en las siguientes regiones anatómicas^(32,48,62)

A) Hipofaringe; Anatómicamente la hipofaringe se extiende desde el plano del hueso hioides por encima del plano del borde inferior del cartílago cricoide más abajo. Compuesto de tres partes: sobre todo del, sino piriforme, el área poscricoides y la pared posterior de la faringe, la hipofaringe excluyendo la laringe. Casi todos los cánceres hipofaríngeos son carcinomas celulares escamosos en un 90 %^(43,48)

B) Laringe: El carcinoma de células escamosas representa alrededor del 95% de los tumores localizados en laringe y en individuos por arriba de la quinta década de la vida.

C) Cavity Bucal:

-**Labios**; El labio inferior es asiento de 90% de carcinomas epidermoides, 10% corresponde al labio superior.

-Lengua bucal; El 75% de las neoplasias se manifiestan en lengua anterior principalmente en el borde lateral, en ésta localización hay mayor probabilidad de metástasis.

-Piso de boca; Localizados en su mayoría en línea media anterior, la extensión de los tumores es en general hacia la cara ventral de la lengua y periostio de la mandíbula. Éste tipo de tumor puede llegar a invadir la glándula submandibular.

-Encía; Se ve afectada en un 70%, siendo encía inferior la más afectada y en la cual se registran carcinomas epidermoides de tipo convencional y tipo verrucoso.

-Mucosa bucal; El carcinoma epidermoide puede encontrarse en los surcos vestibulares, generalmente se presenta el tipo verrucoso localmente invasivo.

-Trígono retromolar; Debido a la sensación de cuerpo extraño que producen los tumores en ésta localización 60% son diagnosticados cuando miden menos de 5cm de diámetro. Penetran con facilidad a estructuras vecinas como las encías y la fosa amigdalopalatina. Lateralmente pueden adentrarse en mucosa bucal e invadir la mandíbula, además constituye una región de desarrollo de linfomas

-Paladar duro; El paladar duro es el sitio donde se presenta mayor cantidad de tumores derivados de glándulas salivales menores, los tumores malignos pueden extenderse a encía, paladar blando e infiltrar hueso y penetrar a cavidad nasal y seno maxilar. (46,48,75)

D) Orofaringe: Es la parte media de la faringe, detrás de la boca e incluye el tercio posterior de la lengua, el paladar blando, la parte lateral y posterior de la garganta y las amígdalas. La faringe es un tubo hueco de alrededor de 5 pulgadas de largo que comienza detrás de la nariz y termina en la parte superior de la tráquea. La mayoría de los cánceres de la orofaringe son carcinomas de células escamosas. (60,32)

-Clasificación de Neoplasias Malignas de vías aerodigestivas (Cavidad Bucal, Hipofaringe, Laringe, Tonsila) (75)

El sistema TNM está basado en la extensión del tumor (**T**), la extensión de la diseminación a los ganglios linfáticos (**N**), y la presencia de metástasis (**M**). En la tabla 2 se muestra las clasificación, donde un número se añade a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y la extensión de la diseminación.

(Ver tabla 2) (20,32,48,60)

TABLA 2.- Sistema TNM de clasificación por estadio clínico

TUMOR PRIMARIO	(T)
Tumor no valorable	Tx
Tumor no evidente	T0
Carcinoma in situ	Tis
Tumor de 2cm o menos en su dimensión mayor	T1
Tumor de 2 a 4 cm en su dimensión mayor	T2
Tumor mayor de 4cm en su dimensión mayor	T3
Labio: Tumor que invade estructuras adyacentes(cortical ósea, lengua,piel de cuello)	T4
Cavidad bucal: Tumor que invade estructuras adyacentes (cortical ósea, partes blandas de cuello, músculos profundos extrínsecos de la lengua, seno maxilar y piel)	T4

Ganglios cervicales	(N)
Ganglios linfáticos regionales no valorables	Nx
Sin ganglios linfáticos regionales metastásicos	N0

Metástasis ganglionar linfática única ipsilateral de 3 cm o menos en su mayor dimensión	N1
Metástasis ganglionar linfática única ipsilateral de 3-6cm en su dimensión mayor o existen múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno mayor de 6cm en su máxima dimensión o ganglios bilaterales o contralaterales, ninguna mayor de 6cm en su máxima dimensión.	N2
Ganglio ipsilateral único mayor de 3cm pero menor de 6cm.	N2 a
Múltiples ganglios ipsilaterales menores de 6cm	N2 b
Ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales menores de 6cm	N2 c
Metástasis a un ganglio de más de 6cm en su dimensión mayor	N3
Ganglio ipsilateral mayor de 6cm	N3 a
Ganglio bilateral mayor de 6cm	N3 b

Metástasis distantes	(M)
Metástasis a distancia novalorables	Mx
Ausencia de metástasis a distancia	M0
Presencia de metástasis a distancia	M1

La tabla muestra el sistema TNM para la clasificación de los tumores de acuerdo a los parámetros de estadio y sitio del tumor primario (T), tamaño y multiplicidad de nódulos metastásicos bilaterales o unilaterales (N), así como presencia o ausencia de metástasis a distancia (M)

TABLA 3.-ETAPAS CLÍNICAS

TIS N0 M0	0
T1N0M0	I
T2N0M0	II
T3N0M0	III
T1N1M0	
T2N1M0	
T3N1M0	
T4N0M0	IV A
T4N1M0	
Cualquier TN2M0	
Cualquier T N3M0	IVB
Cualquier N M1	IVC

En la tabla se muestra la clasificación de etapa clínica del paciente derivada de la clasificación TNM antes mencionada. (ver tabla 2)

5.- Epidemiología del cáncer de vías aerodigestivas superiores.

Las neoplasias malignas de las vías aerodigestivas superiores que representan el 12% de las lesiones malignas en cabeza y cuello con 2269 casos. Los sitios específicos se distribuyen de la siguiente manera; cáncer laríngeo 42 % , cáncer bucal 37%, cáncer de fosas nasales y senos paranasales 9%, cáncer de bucofaringe 6%, cáncer de nasofaringe 3% cáncer de hipofaringe 3%.

La letalidad estimada para el cáncer de vías aerodigestivas es el siguiente; cavidad bucal 62.4%, laríngeo 93%, bucofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y fosas nasales y senos paranasales 47%^(2,38,39)

En 1980 la incidencia de cáncer de cavidad bucal en México con base en los datos de mortalidad se estimaba que era de 4.6/10⁵ en hombres y de 2.4/10⁵ en mujeres. Frías Mendivil y cols en 1997 describieron en un estudio descriptivo epidemiológico de 633 casos durante el período de 1985-1992 que el mayor porcentaje de casos correspondían a hombres en una edad promedio de 60 años, el sitio más frecuentemente afectado era lengua y la variante histológica había sido carcinoma de células escamosas en un 71 %. ⁽²⁾ El porcentaje mayor se presentó en etapas clínicas avanzadas (III y IV) En un estudio descriptivo realizado en la Unidad de Investigación Epidemiológica y Servicios de Salud. IMSS, en el cual participaron 13 hospitales de éste instituto durante la década de 1991-2000 consideraron todos los registros de cáncer bucal, reportó que durante este período se registraron 8800 casos de los cuales el 64.6% fueron hombres. La mortalidad se fué de 50.4% por cada 100000. De acuerdo a la topografía de cavidad bucal se encontró el cancer de lengua en un 25.1%, glándulas salivales 24% y tonsila-orofaringe en 14.2% (Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008 Jan-Feb; 46(1):101-8)

En la actualidad las neoplasias de cabeza y cuello representan el 17.6% de la totalidad de neoplasias malignas registradas en el Registro Histopatológico de las Neoplasias en 2002 (108,064), hasta el 12% son carcinomas de células escamosas de las vías aerodigestivas superiores que en el 65% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas asociándose a un pronóstico de supervivencia y funcional muy pobre. Los sitios específicos se distribuyen de la siguiente manera; cáncer laríngeo 42%, cáncer bucal 37%, cáncer de fosas nasales y senos paranasales 9%, cáncer de bucofaringe 6%, cáncer de nasofaringe 3% y el cáncer de hipofaringe 3%. Se prevé un incremento en la incidencia de los carcinomas escamosos debido a un importante aumento de tabaquismo sobre todo en personas jóvenes. La letalidad estimada para el cáncer de vías aerodigestivas incluye para cáncer bucal un 62.4%, laringe 93%, bucofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y fosas nasales 47%. La mortalidad mundial del cáncer bucal es del 2.8% según Globocan 2000 (33)

Las tasas de supervivencias a cinco años varían entre 18 y 62% según sexo, raza y localización anatómica. Para cada sitio anatómico las tasas son menores entre los varones que entre las mujeres. El cancer bucal se caracteriza por un alta incidencia de segundos tumores primarios de cavidad bucal y sitios adyacentes.(32,35)

6.- VPH y Carcinoma de Células Escamosas de VADS

-Antecedentes

1969 IARC realiza las primeras investigaciones a cerca de VPH, posteriormente en 1971 se describe el proceso de carcinogénesis del virus papiloma humano, en 1977 son descritos los coilocitos de las células de carcinoma escamoso. En 1983 El IARC aisla el virus papiloma humano tipo 16, en 1985 De Villers describe el VPH en pacientes con Ca bucal.⁽⁶⁷⁾ Chang en 1989 describió el VPH tipo 16 en pacientes con Ca bucal.⁽⁷⁸⁾ Más tarde, en 1995 IARC reconoce al VPH como carcinógeno en seres humanos.⁽¹⁰⁾ En 1998 Schwartz y cols. Informan de la posible transmisión de la infección VPH en sujetos mediante el acto sexual oro-genital.

Los factores de transmisión del VPH en las superficies epiteliales descamadas y ulceradas puede deberse al contacto directo oro-genital, sexo oral, infecciones anogenitales, en pacientes con múltiples parejas sexuales e incluso por instrumental médico. H. Zur Hausen describió a los virus papiloma del humano de alto riesgo y bajo riesgo.^(21,22) En el año 2000 Gillison y cols realiza un estudio de 253 casos de carcinoma de cabeza y cuello en los cuales detecta un 25% de positividad al VPH, siendo el tipo 16 el tipo viral encontrado en el 90% de las muestras.⁽³⁾ En el 2001 Zur Hausen informó que los VPH 16 y 18 se habían encontrado en el 60% de las muestras de carcinoma de células escamosas bucal. En el 2000 Wong Munger nos habla de que existen más de 100 tipos virales de VPH.^{(J Natl Cancer Inst. 2000 May 3;92(9):675-7)} En el año 2002 Ibieta y cols. Encuentran un 42% de positividad al VPH mediante técnicas de PCR en 51 muestras con carcinoma bucal de células escamosas.⁽⁶⁸⁾

En el año 2008 se reportó en un estudio realizado en individuos mexicanos con Ca bucal una positividad al VPH en un 43.5% de 62 muestras de Carcinoma bucal, la edad promedio fue de 62 años de edad y los tipos virales encontrados con mayor frecuencia fueron VPH tipo 16 y 18 (55.6% y 18.5% respectivamente). (47)

Se estima que entre el 85- 90% de los casos con cáncer de las vías aerodigestivas superiores son explicadas por la exposición a tabaco y la ingesta de alcohol tiene un efecto sinérgico con el tabaquismo. Herity reportó la asociación entre la cantidad de alcohol consumido y el riesgo para cáncer de lengua. Sin embargo existe una fuerte evidencia epidemiológica y molecular que apoya al VPH como agente responsable de un grupo de pacientes con cáncer de células escamosas. (3,43,50)

Los VPH han sido ampliamente estudiados como agentes patogénicos de los carcinomas de células escamosas especialmente de la variedad 16. Un mecanismo descrito en la carcinogénesis por virus del papiloma humano es la inactivación de p53 por la oncoproteína E6 del VPH la presencia de VPH también se ha relacionado con la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). (54,66,70.71.73)

En displasia epitelial y carcinoma de células escamosas bucal se han determinado secuencias de DNA de VPH mediante técnicas de diagnóstico molecular. Siendo el VPH tipo 16 el tipo viral encontrado con mayor frecuencia. Reportes de Lawton en 1992 determinaron VPH en un 60%de las muestras recolectadas en 60 individuos; en este estudio el genotipo de VPH 16 fue también el más encontrado. Algunos tipos virales también han sido identificados en lesiones premalignas.(76)

Se reconoce que dos tipos de virus del papiloma humano VPH 16 y VPH18 asociados a procesos malignos del tracto genital podrían relacionarse también con diferentes tipos de cáncer de orofaringe y bucal ^{26,30}

Los VPH especialmente variantes del tipo 16 pueden asociarse a neoplasias malignas bucales del mismo modo que en las neoplasias de cervix uterino.

Watts y cols en 1991 encontró un alto porcentaje de positividad para VPH en carcinomas bucales de pacientes con hábito de mascar tabaco y nuez de betel.

(79)

Mao y cols 1995 encontró un índice de infección de VPH del 30.8 % en lesiones de cáncer bucal y un 26.9% en los sitios no afectados del mismo paciente.⁽⁶⁾ Koskinen y cols 2003 reportaron prevalencia y estatus del DNA de VPH en muestras de cáncer de cabeza y cuello, encontrando de 61 muestras el 61% positivos para VPH , de éstas muestras 31 de 37 (84%) fueron positivas al VPH tipo 16 y 10 de 37 (22%) fueron positivas para VPH tipo 33⁽³⁸⁾

II.- JUSTIFICACIÓN

Los epitelios estratificados se ven afectados por la presencia del virus del papiloma humano en sus diferentes genotipos específicos, propiciando en ellos un aumento en la proliferación celular, cambios en su ciclo replicativo e inmortalización del queratinocito promovido por el gen E6 viral. ^(5,10,18) Debido a ésta clara asociación entre la infección por papilomavirus y el desarrollo de displasias y lesiones neoplásicas de varios tejidos, aparece como uno de los agentes etiológicos más importantes involucrados en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del epitelio, incluyendo aquéllas que involucran la mucosa bucal y vías aerodigestivas superiores ^(69,74,75)

Debido a éste epiteliotropismo que caracteriza a los VPH, sugerimos que existe una homología entre la patogenicidad del virus del papiloma humano en los epitelios ano-genitales con la encontrada en epitelio de orofaringe, laringe e hipofaringe (VADS).. Consideramos que ciertos factores socio-culturales pueden influir en la actualidad para el desarrollo de éste tipo de infecciones virales.

Actualmente se encuentra ampliamente documentado el papel oncogénico de los VPH de alto riesgo en las células epiteliales induciendo a través de fenómenos moleculares específicos la inactivación o degradación de genes supresores del tumor y activación de oncogenes, contribuyendo de ésta forma al desarrollo de neoplasias epiteliales determinadas como en el caso de cáncer de cérvix en donde el 99.7% de los casos se asocian a una primoinfección viral (VPH). ^(35,36,70) De tal manera, se considera que el comportamiento oncogénico de éste virus dentro del epitelio de tracto digestivo superior pueda ser similar a

lo ocurrido en los epitelios vulvar, vaginal y cervical dada su semejanza histológica.

III.- HIPÓTESIS

-En la mayoría de los carcinomas de células escamosas de vías aerodigestivas superiores estarán presentes los VPH de alto riesgo y con mayor frecuencia el VPH tipo 16.

IV.- OBJETIVO

-Identificar la frecuencia y tipo de virus del papiloma humano presente en carcinoma de células escamosas de vías aerodigestivas superiores

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se recabaron 60 muestras correspondientes a carcinomas epiteliales de vías aerodigestivas superiores. Todas las muestras fueron obtenidas mediante consentimiento informado de los pacientes y aprobado por el comité de ética local del Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

1.- Tejidos y muestras de carcinoma de Vías aerodigestivas superiores.

Se llevó a cabo un banco de tejidos compuesto por muestras de carcinoma de células escamosas tomadas de sitios anatómicos característicos de vías aerodigestivas como lo son; hipofaringe, laringe, lengua, piso boca, paladar, encía, trígono retromolar, tonsila, carrillo y cavidad bucal de pacientes adultos. Las muestras fueron partidas a la mitad; la primera parte se fijó en etanol y se incluyó en parafina para la corroboración del diagnóstico histopatológico. La parte restante de cada muestra se trató con el reactivo trizol de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (GIBCO).

Cada muestra cuenta con una ficha de archivo en la cual se recabaron los siguientes datos clínicos; sexo, edad, antecedentes hereditarios de cáncer, tabaquismo, alcoholismo, diagnóstico clínico, diagnóstico histopatológico, estadio de la lesión TNM, situación del paciente.

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

2.- Extracción y purificación del DNA genómico de muestras.

El DNA de los tejidos se purificó utilizando el estuche *Wizard SV Genomic DNA* (Promega, Co.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tejido se homogenizó en Trizol y se colocó en microtubos de 1.5 ml. Se separaron las fases de RNA, DNA y proteínas, con 200µl de cloroformo y centrifugación a 13,000 x g por 10 min. Para precipitar el DNA se agregaron 300µl de etanol absoluto y se centrifugó a 2,000 x g por 5 min. Para separar el trizol, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1ml de citrato de sodio en etanol 10% y se centrifugó a 2,000 x g por 5 min, este procedimiento se realizó tres veces. Para lavar la pastilla, se decantó el sobrenadante y se agregó 1ml de etanol 70% y se centrifugó a 2,000 x g por 5 min. Para lisar las células del tejido, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 600µl de amortiguador de lisis (incluido en el estuche), más 20µl de proteinasa K (20mg/ml) y se incubó durante 72 h a 56°C. Una vez digerido el tejido, se adicionaron 200µl de la solución de precipitación de proteínas y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó por 3 min a 13,000 x g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionaron 600µl de isopropanol frío para precipitar el DNA. Por último, se centrifugó durante 1 min a 13,000 x g y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, para ser finalmente rehidratada en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril. La calidad del DNA se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría.

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

3.-Detección de virus del papiloma humano en muestras de carcinoma de células escamosas de Vías aerodigestivas superiores.

La detección de secuencias del VPH se llevó a cabo utilizando la *Taq DNA polymerase* (Promega, Co.) y los iniciadores específicos E6-VPH16f/E6-VPH16r para el gen E6 de VPH16 (nucleótidos 110 a 235), que amplifican una región de 126 pares de bases, seguido de la PCR (Figura 3). En los casos que no hubo amplificación con los iniciadores específicos para VPH16, se realizó la PCR con los iniciadores consenso GP5+/GP6+ para la región conservada L1 de 150 pares de bases del genoma viral

Cada reacción se realizó con 200 ng de DNA en 50 µl de solución con amortiguador 1X (KCL 50mM, Tris-HCl 10mM, Tritón X-100 0.1%), MgCl 2mM, dNTP 0.2 mM de cada uno (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 unidades de *Taq* polimerasa y 50 pmol de cada iniciador. La PCR se realizó en un termociclador, *Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480*, con las siguientes especificaciones: 94°C por 5 min para desnaturalización, 40 ciclos de 94°C por 30s para abrir cadenas, 55°C por 1.5 min para la hibridación de iniciadores y 72°C por 1.5 min para la fase de alargamiento. Se finalizó con 7 min a 72°C para terminar el alargamiento de las cadenas de DNA.

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
 ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

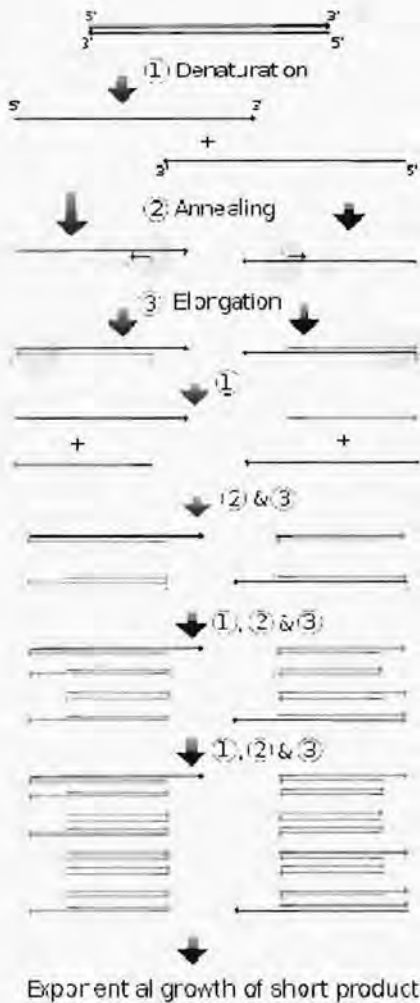


Figura 3.- Se muestra el esquema de una reacción de cadena de polimerasa (PCR), en la cual el paso 1 corresponde a la desnaturalización de las cadenas de DNA blanco, el paso 2 corresponde a la alineación de los iniciadores con las cadenas desnaturalizadas. El paso 3 indica la elongación en la cual participa la Taq polimerasa y los oligonucleótidos. Posteriormente a dichos pasos se esquematiza la amplificación exponencial que ocurre en cada ciclo a partir del del DNA blanco.

RESULTADOS

Nuestro estudio incluyó 60 muestras correspondientes a vías aerodigestivas superiores, de las cuales 39 fueron casos masculinos y 21 casos femeninos. Como se muestra en la tabla 3, de las 60 muestras analizadas se obtuvo un 58% de positividad para la presencia del VPH. De las cuales 31 muestras fueron positivas a la secuencia de VPH tipo 16 y 4 resultaron positivas a otros tipos virales.

TABLA 4.- Resultados por PCR

	Frecuencia n=60	Porcentaje	
POSITIVOS VPH	35	58%	51.6%
Pos VPH 16	31		
Pos. otros tipos VPH	4	6.6%	41.6%
NEGATIVOS VPH	25		
Total	60		100,0

En la siguiente tabla se indica la frecuencia y porcentaje de los casos positivos a VPH tipo 16, así como los casos positivos a otros tipos virales de un número de muestras (n) = 60



Figura 4 (a).- Amplificación con primers específicos para el gen E6 de VPH16. La flecha muestra la posición del producto esperado (480 pb). Cada carril corresponde a una muestra y los asteriscos señalan donde no se obtuvo producto amplificado, (N) corresponde a nuestro control negativo, (P) al control positivo, (MP) al marcador de peso molecular. Las muestras negativas fueron sometidas a una amplificación consecutiva con primers GP5/6 (Figura 5).

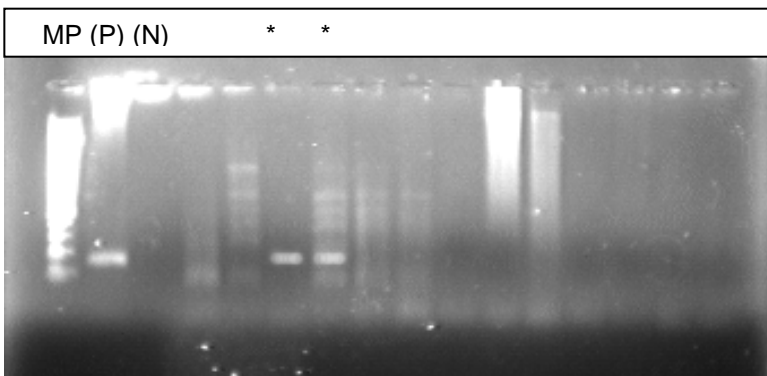
MP A B C (N) D E (P)

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor .



480pb

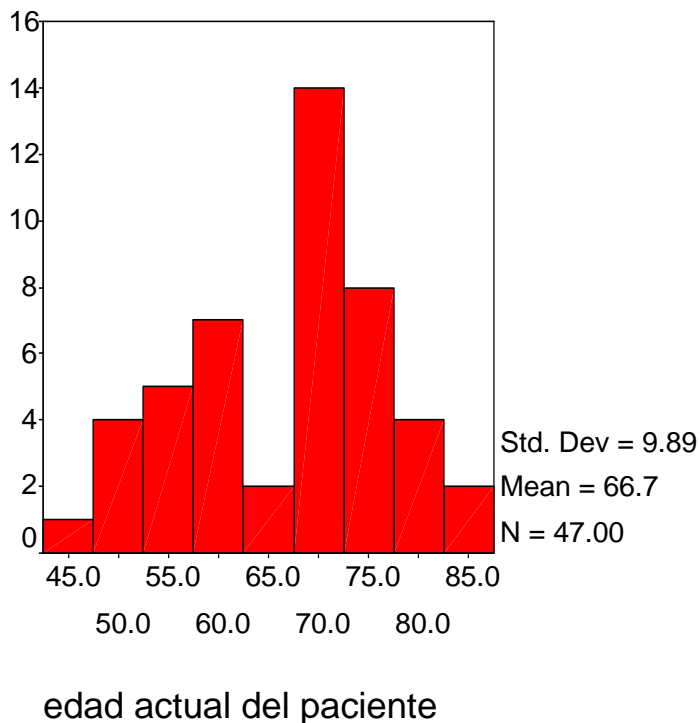
Figura 4 (b).- Se muestra nuevamente la amplificación con primers específicos para el gen E6 de VPH16 de cinco muestras de Ca de células escamosas de vías aerodigestivas superiores correspondientes a cada carril marcados como A, B, C, D, las cuales resultaron positivas. La flecha indica el producto esperado, (N) corresponde al control negativo, (P) corresponde al control positivo y (MP) al marcador de peso molecular.



150pb
GP5 /GP6

Figura 5.- Amplificación con primers generales GP5/GP6. Se sometieron a este PCR las muestras previamente negativas (ver figura 4a) con los primers específicos para el gen L1 del VPH16. Los asteriscos indican las muestras negativas a la PCR anterior y que resultaron positivas a los primers para gen L1. La flecha muestra la posición del producto esperado

Como se muestra en la gráfica 1, la mayoría de los casos de carcinoma de vías aerodigestivas superiores se presentaron entre la 7a. y 8a década de la vida y no se observaron diferencias significativas en relación a la edad y los casos infectados por VPH.



Gráfica 1.- En la siguiente gráfica se muestran los rangos de edad de los pacientes que presentaron los carcinomas de células escamosas de vías aerodigestivas superiores. Se observa que la edad con mayor frecuencia se encuentra entre la 7ª. Y 8ª década de la vida.

Tabla 5.- Frecuencia de casos femeninos y positivos en las muestras estudiadas.

	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	39	65,0
Femenino	21	35,0
Total	60	100,0

En la anterior tabla se muestra el número de casos masculinos y femeninos presentados en las muestras estudiadas en nuestro trabajo de investigación.

Como se muestra en la tabla 5, el diagnóstico clínico encontrado con mayor frecuencia en las muestras de cancer de vías aerodigestivas superiores correspondieron a los siguientes sitios anatómicos; Ca. lengua 13.3 %, Ca laringe 26.7%, y Ca de encía 13.3%. De los demás sitios anatómicos obtuvimos

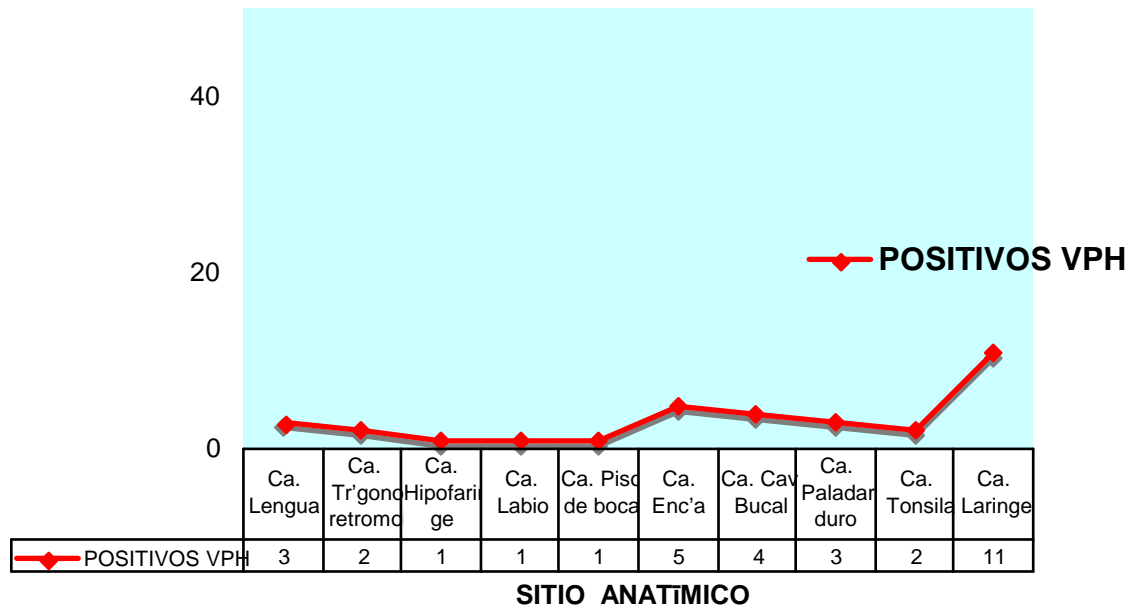
al menos una muestra de cada sitio anatómico. Observamos que de las muestras obtenidas de trigono retromolar, tonsila, paladar duro, hipofaringe y cavidad bucal el total de ellas fueron positivas a infección por VPH. (Ver gráfica 2) Sin embargo por el número reducido de muestras no se considera estadísticamente significativo. En el caso de paladar duro encontramos que las tres muestras fueron positivas a VPH, dos de ellas a VPH tipo 16 y la restante a otros tipos virales. De las dos muestras obtenidas de trigono retromolar ambas resultaron positivas a otros tipos virales.

Tabla 6.- Diagnóstico clínico de carcinoma de los casos estudiados presentados por sitio anatómico.

	Frecuencia	Porcentaje
Ca lengua	8	13,3
Ca Laringe subglotico	1	1,7
Ca Trigono retromolar	2	3,3
Ca Laringe supraglótico	3	5,0
Ca Laringe	16	26,7
Ca Labio	5	8,3
Ca Piso de Boca	2	3,3
Ca Encia	8	13,3
Ca Cavidad Oral	4	6,7
Ca Carrillo	1	1,7
Ca Laringe transglótico	3	5,0
Paladar duro	3	5,0
Ca Hipofaringe	1	1,7
Amigdala	2	3,3
Total	59	98,3
	1	1,7
Total	60	100,0

Se observa en la tabla la frecuencia de casos de carcinoma de células escamosas diagnosticados por sitio anatómico.

MUESTRAS POSITIVAS A VPH POR SITIO ANATÓMICO



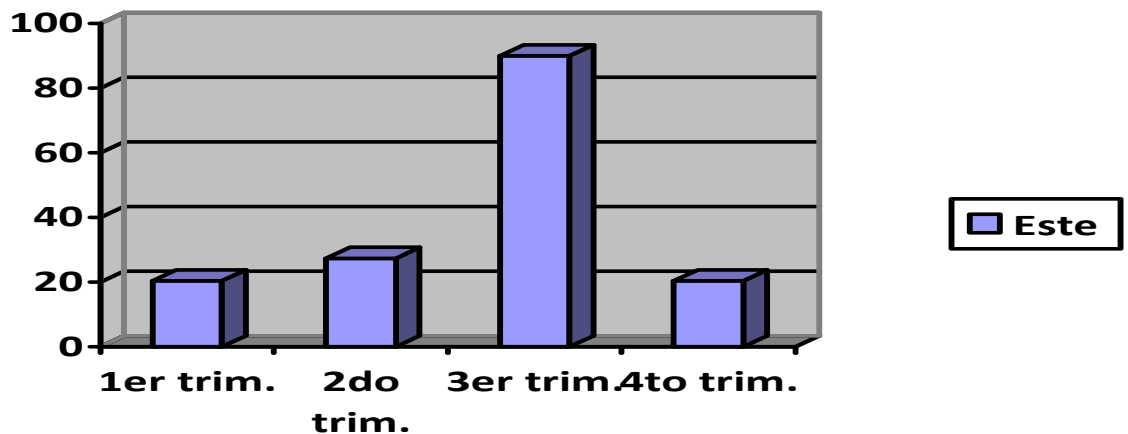
Gráfica 2.- Se observa en la gráfica el número de muestras que resultaron positivas a VPH mediante PCR. Se indica el número de muestras por sitio anatómico, observándose que los sitios anatómicos con mayor número de muestras positivas fueron laringe, encía y cavidad bucal..

El diagnóstico histopatológico encontrado en la mayoría de las muestras fue de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado invasivo, en un 38.3 % del total, cabe resaltar que 15 de las 23 muestras con éste diagnóstico resultaron negativas a infección por VPH. (Ver tabla 6) Así mismo, como se muestra en la gráfica 2; encontramos que en las muestras positivas a VPH prevalecieron los tipos histopatológicos siguientes; carcinoma de células escamosas bien diferenciado invasivo, carcinoma moderadamente diferenciado y carcinoma epidermoide.

Tabla 7.-Diagnóstico histopatológico de los casos estudiados.

	Frecuencia	Porcentaje
Ca Epidermoide moderadamente dif. inv.	23	38,3
Ca Epi. Bien dif. inv.	11	18,3
Ca Epi. tipo verrucoso	2	3,3
Ca. Epidermoide	12	20,0
Ca Epi. poco diferenciado	3	5,0
Ca Epi. bien diferenciado ulcerado e infiltrante	2	3,3
Ca Epi moderadamente diferenciado	1	1,7
Tumor de células gigantes	1	1,7
Ca poco diferenciado de células claras	1	1,7
Tumor mixto maligno exadenoma pleomorfico	1	1,7
Total	60	100,0

En la tabla anterior se muestra la frecuencia ocurrida en diagnóstico histopatológico presentado en los casos estudiados. Se observa que las en la mayoría de los casos el diagnóstico histopatológico correspondió al tipo moderadamente diferenciado invasivo.



Gráfica 3.- Se indica en la gráfica el diagnóstico histopatológico correspondiente a las muestras que resultaron positivas a VPH. Observamos que en su mayoría las muestras positivas son de tipo moderadamente diferenciado y bien diferenciado

La clasificación TNM que observamos con mayor frecuencia en los casos estudiados fue de T4 N0 M0, en éste estadio los tumores fueron positivos al

VPH en 12 de las 15 muestras. Como segundo lugar en frecuencia observamos el estadio T2N0M0 que registró 4 positivos a VPH. (Ver tabla 7)

Tabla 8.- Clasificación TNM en muestras positivas a VPH

T	N	M	Frecuencia	Positivos VPH
1	0	0	1	
2	0	0	9	4
2	1	0	4	
2	2	0	1	
2	3	0	3	
3	0	0	6	3
3	1	0	5	3
3	2	0	1	
4	0	0	15	12
4	1	0	4	
4	2	0	5	3
4	3	0	2	

Se indica en la tabla las muestras positivas a VPH y la frecuencia observada en ellas mediante la clasificación TNM, en donde (T) corresponde a tamaño de tumor, (N) número de nódulos linfáticos comprometidos y (M) metastasis presentes.

De los casos estudiados el 66.7% de ellos no tuvo antecedentes de cancer previos. (Tabla 8). En la correlación infección viral y antecedentes de cancer observamos que de los 20 casos reportados con antecedentes de cancer, 12 de ellos fueron positivos a las secuencias virales y 19 casos de los 40 reportados sin antecedentes de neoplasias fueron positivos al virus papiloma humano.

Tabla 9.- Antecedentes de cancer reportados en los casos estudiados

	Frecuencia	Porcentaje
Si	20	33,3
No	40	66,7
Total	60	100,0

La tabla muestra los casos reportados con antecedentes de cáncer al momento de realizar la biopsia, observamos que el porcentaje de las muestras con antecedentes de cancer fue menor a los casos reportados sin neoplasias previas.

En cuanto a los antecedentes de consumo de tabaco (Tabla 9) y alcohol (Tabla 10) encontramos que de los 60 pacientes, 42 de ellos reportaron tabaquismo, de los cuales 23 fueron positivos a la infección por virus papiloma humano. En referencia a consumo de alcohol de 46 pacientes, 25 muestras fueron positivas a infección por VPH.

Tabla 10.- Antecedentes de tabaquismo en los casos estudiados.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	42	70,0
No	18	30,0
Total	60	100,0

En la tabla se indica la frecuencia de casos estudiados con antecedentes de tabaquismo, observamos un porcentaje considerablemente mayor de pacientes que fumaban con relación a los que no fumaban.

Tabla 11.- Ingesta de alcohol en los casos estudiados.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	46	76,7
No	14	23,3
Total	60	100,0

La tabla muestra los casos que reportaron ingesta de alcohol previa con un alto porcentaje en relación a los casos que no tuvieron antecedentes.

Como se muestra en la tabla 11, en defunción se reportaron 20 fallecimientos hasta la fecha del análisis, 11 casos masculinos y 5 femeninos, 13 de los

mismos fueron positivos al VPH. Se registraron 32 pacientes vivos hasta la fecha del análisis sin actividad tumoral, de los cuales 15 de ellos fueron positivos al VPH. Así mismo de los 4 pacientes vivos con actividad tumoral, 3 de ellos fueron positivos a las secuencias del virus papiloma humano. Correlacionando defunción con diagnóstico histopatológico observamos que aquéllos casos con diagnóstico de carcinoma verrucoso y Carcinoma escamoso bien diferenciado hasta la fecha del análisis no habían fallecido.

Tabla 12.- Situación del paciente

	Frecuencia	Porcentaje
Defunción	20	33,3
FTO	1	1,7
VSAT	32	53,3
VCAT	4	6,7
Total	57	95,0
	3	5,0
Total	60	100,0

En la anterior tabla se puede observar la situación del paciente a la fecha del análisis, en la cual (D) defunción, (VSAT) vivo sin actividad tumoral, (VCAT) vivo con actividad tumoral.

Observamos también que el mayor número de defunciones correspondieron a casos de carcinomas localizados en laringe, encía y cavidad bucal. De los 4 pacientes vivos con actividad tumoral a la fecha del análisis se reportaron 3 con infección al VPH.

DISCUSIÓN

El carcinoma de células escamosas de vías aerodigestivas superiores afecta sitios anatómicos funcionales de tracto digestivo y respiratorio superior. Estos sitios anatómicos son susceptibles a infección por VPH, dado que el virus papiloma humano tiene especial tropismo por el epitelio de células escamosas y su ciclo productivo es mantenido por dichas células epiteliales basales.^(18,21,22)

De ésta manera, consideramos que el epitelio de vías aerodigestivas superiores es susceptible a la infección por VPH debido a los resultados obtenidos en nuestro estudio. Coincidentemente a los artículos publicados alrededor del mundo que reportan positividad para VPH de un 60-67%^(69,74,75,) obtuvimos un 58% de positividad al virus papiloma humano en cáncer de vías aerodigestivas superiores. Similar al estudio reportado en cáncer bucal en el 2001, Zur Hausen quien informó de los VPH 16 y 18 que se habían encontrado en el 60% de las muestras de carcinoma de células escamosas bucal.^(21,22) De igual forma y acorde a los datos reportados por artículos de poblaciones americanas, Venezuela y Brasil que reportan también positividad para VPH de un 60-67% en cáncer bucal. En México se ha reportado de un 42% a 61% de positividad al virus. Ibieta y Lizano reportaron en el año 2002 un 42% de positividad al VPH mediante técnicas de PCR en 51 muestras con carcinoma bucal de células escamosas.⁽⁶⁸⁾ Anaya- Saavedra y cols publicaron en el 2008 un estudio desarrollado en 62 casos de carcinoma de células escamosas bucal, encontrando un 43% de positividad al virus del papiloma humano muestras con carcinoma bucal de células escamosas.⁽⁶⁸⁾

La incidencia de estos tipos de cáncer se incrementa con la edad, presentándose en pacientes adultos mayores encontrándose una media de 60

años. Nuestros datos clínicos coinciden con la epidemiología ya descrita en cuanto al sexo masculino con el mayor número de casos, así como la edad en la cual se desarrollaron la mayoría de los casos entre la 7^o y 8^o década de la vida. El virus papiloma humano se ha considerado factor etiológico en el desarrollo de carcinomas incluyendo orofaringe y boca. Andrews et al en 2008 reporta 85 % de positividad a VPH de alto riesgo en cáncer de orofaringe (base de lengua y tonsila)⁽⁵²⁾ , nuestro estudio arroja resultados interesantes a este respecto ya que los casos estudiados de carcinoma de trigono retromolar, tonsila e hipofaringe resultaron positivas al virus en la totalidad de dichas muestras, lo que podría sugerir que efectivamente a lo reportado en estudios de orofaringe con alta incidencia a VPH ^(35,43,49,51,53,54,55,63), dicha área anatómica sea más susceptible a la infección por el virus del papiloma humano.

De acuerdo a los resultados, el porcentaje de positividad viral no nos indica que la infección por el virus sea un determinante en el desarrollo de las neoplasias de VADS, ya que en los casos estudiados se observan también otros factores carcinogénicos como tabaquismo y alcoholismo en un alto porcentaje de los pacientes. Sin embargo consideramos que nuestro trabajo arroja datos interesantes dados los resultados obtenidos y la amplitud de áreas anatómicas que incluimos, así mismo en relación al diagnóstico histopatológico observamos con interés que los casos con diagnóstico histopatológico de carcinoma verrucoso resultaron positivos al virus, lo cual coincide con reportes de estudios previos en donde se ha encontrado un porcentaje considerable de infección por VPH en éstos tipos de cáncer. También observamos que en los casos de diagnóstico histopatológico de carcinoma bien diferenciado obtuvimos un mayor número de muestras positivas a virus de papiloma humano, lo cual

podría sugerir en nuestro estudio que la infección por el virus papiloma humano tenga cierta implicación en el grado de diferenciación celular en el desarrollo de la neoplasia. También consideramos importante subrayar que a la fecha del análisis; de los pacientes que habían fallecido un porcentaje considerable de ellos había resultado positivo a la infección por el virus papiloma humano, así como los pacientes que seguían vivos con actividad tumoral a esa fecha, sin embargo el número de estos últimos casos fue pequeño por lo que no podemos considerarlos con verdadera significancia estadística. Otro dato interesante que obtuvimos fué que de los pacientes con antecedentes previos de cáncer, éstos obtuvieron un alto porcentaje positivos al virus. De los datos clínicos restantes se coincidió con la epidemiología ya descrita en cuanto al sexo masculino con el mayor número de casos, así como la edad en la cual se desarrollaron la mayoría de los casos entre la 7^o y 8^o década de la vida.

CONCLUSIONES

- Consideramos que el virus papiloma del humano podría estar involucrado como factor etiológico en la mitad de nuestros casos, sin embargo en los casos restantes no podemos considerarlo como agente carcinogénico.
- El virus papiloma humano puede tener una participación importante en el desarrollo de las neoplasias de VADS(vías aerodigestivas superiores) más no determinante como factor etiológico.
- La infección por virus del papiloma humano podría tener cierta implicación en el desarrollo histopatológico de la neoplasia así como en el pronóstico del paciente con carcinoma de células escamosas.
- El epitelio de vías aerodigestivas superiores puede ser susceptible a la infección de VPH, especialmente el área anatómica de orofaringe.

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Ramírez y cols. "Detección de ADN de papilomavirus humano en lesiones orales y tejido normal". *Cancerología* 39(2):1820-1824. (1993)
- 2.-Frías MM y cols."Epidemiología del cáncer de cavidad bucal". *Rev Inst Nal Cancerol Mex* 43(2):81-85 (1997)
- 3.-Gillison M. "Prevalence and Identification of HPV Type in HNSCC".*Journal of National Cancer Institute*, Vol 92, No. 9, May 3,(2000).
- 4.-Almodori y cols. "HPV and CCND1 in laryngeal SCC". *HEAD & NECK* June (2002)
- 5.-X Liu et al. "HPV oncogenes, mutation and oral carcinogenesis". *Oncogene* 14: 2347-2353 (1994)
- 6.- Mao,EJ. "Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cell from normal and malignant epithelia"*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod Sep*; 80(3):320-9.(1995)
- 7.-Guo W, Baluda M, Hee Park. "Ethanol upregulates the expression of p21 WAF1/CIP1 and prolongs G1 transition via a p53-independent pathway in human epithelial cells". *Oncogene* 15:1143-1149 (1997)
- 8.-Shoreyer and Greer." HPV DNA in premalignant and malignant oral lesions".*Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 71 (6) June(1991)
- 9.- Pao-Hsin Lia et al. "Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas". *Oral Oncology* 36:272-276(2000)
- 10.- Herrero R, et al. "Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International agency for research on cancer multicenter study".*J Natl Cancer Inst Dec* 3; 95(23):1772-83. (2003)
- 11.-Hafkamp et al. "HPV integration in HNSCC".*Int. J. Cancer.* 107: 394-400 (2003)
- 12.-Koskinen et al."HPV in head and neck carcinomas". *Int. J. Cancer:* 107: 401-406(2003)
- 13.- Nagpal et al." p53 polymorphism and HPV prevalence in oral cancer". *Int. J Cancer;* 97 :649-653(2002)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

- 14.- Ritchie et al." HPV and survival in oral and oropharyngeal cancers". Int J. Cancer; 104:336-344 (2003)
- 15.-Kassim et al." HSV type 1 proteins in oral squamous cell carcinoma". Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988 Apr;65(4):445-8.
- 16.-Koskinen et al. Int J Cancer. "HPV in head and neck carcinomas". Int J Cancer. 107: 401-406 (2003)
- 17.-García Carrancá et al. "Proteins regulating HPV 18 transcription".Nov 62 (11) 4321-4330
- 18.- Taja-ChayebL, Salas-García M,Salcedo-Vargas M. "Bases moleculares de la carcinogénesis viral de papiloma y polioma". Salud Publica Mex.38:47-57. (1996)
- 19.-Picconi et al. " VHP en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de Ca cervicouterino, tipos virales y variants". Medicina Volumen 62, No. 3 200
- 20.-Regezi J,Sciuba J." Correlaciones clínico-patológicas". Patología Bucal; Ed. Mc Graw Hill Tercera edición. Marzo 2000
- 21.-Harald zur Hausen. "Papillomavirus in Human Cancers", Ed. Humana Press Inc. 246-254(2002)
- 22.-Hararald zur Hausen "Papillomavirus and Cancer", Nature Publishing Group May 2: 342-348. (2002)
- 23--FX Bosch, A Lorincz, N Muñoz " The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer"J CLin Pathol 55:244-265 (2002)
- 24.-Jeffrey LSkar "Principios de manejo del cancer; patología molecular". Principios de Oncología 260-284
- 25.-Karl R. Beutner, MD , PhD "A symposium ; Human Papillomavirus infection". The American Journal of Medicine Volume 102: 11-15. May 5 (1997)
- 26.-Doorbard John. "Review The Papillomavirus life cycle". Journal of Clinical Virology 328 S7-S15 (2005)
- 27.-Hans-Ulrich Bernard. " Review The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses". Journal of Clinical Virology 328 S1-S6 (2005)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

- 28.-Françoise Thierry et al. "A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus Carcinogenesis". Cancer Research, February 64, 894-903, (2004)
- 29.-García Carrancá et al. "Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18". Journal of Virology 62(11)4321-4330 Noviembre (1988)
- 30.-Callejas- Macías et al. "Genomic diversity of human papillomavirus 16,18,31 and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants" Virology.319: 315-323 (2004)
- 31.-Berumen et al. " Genomic amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes". Int J. Cancer 56, 640-645 (1994)
- 32.-** Meneses-García A, Mohar A. "Neoplasias Malignas del Aparato Digestivo y Respiratorio Superiores". Principales Neoplasias Malignas en México, 1ra. ed. Editorial El Manual Moderno, México(1999) .
- 33.- DGE SSA Morbilidad y Mortalidad. "Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas". Secretaria de Salud (2002)
- 34.-Alcocer-González, JM, Berumen J et al. " In vitro expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cell". Viral Immunol Summer 19(3)48, 1-91 (2006)
- 35.- Boscio-Rizzo et al. "HPV-16 L83V variant in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract". J Cancer Res Clin Oncol Apr 135 (4) 559-66 e pub (2008)
- 36.-Berumen J, Casas Leonora et al. "Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes". Int. J Cancer 56: 640-645 (1994)
- 37.- JustineM Ritchie, Smith et al. Human "Papillomavirus infection as prognostic factor in carcinomas of oral cavity and oropharynx". Int J Cancer 104:336-344 (2003)
- 38.-Koskinen Walter, Ren Wei Chen et al." Prevalence and Physical status of Human Papillomavirus in squamous cell carcinomas of head and neck". Int. J Cancer 107: 401-406 (2003)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

- 39.- Díaz Flores- Saavedra Martínez. "Estudio de la prevalencia del virus papiloma humano mediante análisis de fragmentos de restricción por la reacción en cadena de polimerasa". Química clínica 19, 3 (2000)
- 40.-Durazzo M- Nabunco de Araujo et al. "Clinical And Epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: Increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases". Clinics 60(4):293-8 (2005)
- 41.- Ha K Patrick."The role of Human Papillomavirus in oral carcinogenesis". Crit Rev Oral Biol Med 15(4):188-196 (2004)
- 42.- Cruz I.BF, Snidjders et al." Age- dependence of Human Papillomavirus DNA presence in Oral Squamous Cell Carcinomas ". Oral Oncol Eur J Cancer 32(1) :55-62 (1996)
- 43.-Samir K, El Mofty et al. "Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Squamous Cell Carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity in young patients". Am J Surg Pathol 27(11):1463-1470 (2003)
- 44.- Sugiyama Masaru, Kumar Ujjal. "Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic and malignant oral epithelium". Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology 95(5) 594-600 (2003)
- 45.- Ringstrom e, Peters E. et al "Human Papillomavirus type 16 and Squamous Cell carcinoma of the Head and Neck. Clinical Cancer Research" 8: 3187-3192 October (2002)
- 46.- Granados M, "Epidemiología del Cáncer de Cabeza y Cuello Instituto Nacional de Cancerología" 9-17.
- 47.-García Carrancá, Anaya-Saavedra. "High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study" . Med Res Feb 39(2) 189-97 (2008) Epub 2007
- 48.-Tirado y Granados. "Epidemiología y Etiología del Cáncer de Cabeza y Cuello". Cancerología 2(2007) 9-17
- 49.- Golas et al. "Rising Incidence of Oropharyngeal Cancer and the Role of Oncogenic Human PapillomaVirus". Community Dent Oral Epidemiol. 35(2); 98-108(2007)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

- 50.- Kleist B. et al "Different risk factors in basaloid and common squamous head and neck cancer".
Laryngoscope 114(6);1063-8 (2004)
- 51.- Andrews E, Seamen et al. "Oropharyngeal carcinoma in non smokers and no drinkers: A role
for HPV" Nov 20 (2008)
- 52.- Liang et al. "Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer:the
Mayo Clinic experience" J Oral Maxillofac Surg 66(9):1875-80. (2008)
- 53.- Charfi L et al. "Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by
distinct etiology molecular features and outcome" Cancer Lett Feb 18, 260(1-2):72-8 Epub (2008)
- 54.-Westra et al." Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive
p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck" Jan;14(2):366-9(2008)
- 55.- Scott E. Et al. "Squamous Cell Carcinoma of the tonsils" Clin Cancer Res 8(4):1093-110(2002)
- 56.- UobeK, et al "Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinoma by in situ PCR" Oral
Oncol37(2):146-52
- 57.- Cao et al. "Human papillomavirus infection and p53 alteration in oral squamous cell carcinoma"
Chin J Dent Res Nov 3(3):44-9 (2000)
- 58.- Anneroth G. Batsakis J et al "Review of the literatura and recommended system of malignancy
grading in oral squamous cell carcinomas" Scand J Dent Res 95:229-49 (1987)
- 59.-** Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. "Malignancy grading of the deep invasive margins of
oral squamous cell carcinomas has high prognostic value". *J Pathol* **166**:375-81. (1992;)
- 60.- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator
than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*;18:432-7 (1989)
- 61.-Weijers M, Snow GB "Malignancy is no better than convencional hisitopathological grading in
small squamous cell carcinoma of tongue and floor of mouth retrospective study in 128 patient" J
Oral Pathol Med 38 (4); 343-7 Epub 2009
- 62.-Shah J, et al Oral Cancer Ed. Martín Dunitz (2003) capítulo 1;77-181
- 63.- de Villiers Em et al. "Papillomaviruses in benign and malignant tumors of the mouth upper
respiratory tract" Laryngol Rhinol Otol (Stutg) 65(4):177-9 (1986)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

- 64.- Zur Hausen et al. "Viruses in human cancers" Science 254: 1167-73(1991)
- 65.- De Villiers EM."Human pathogenic papillomavirus types: an update" Curr Top Microbiol Immunol 186:1-12 (1994)
- 66.- Zur Hausen H. "papillomaviruses causing cancer evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis" J Natl Cancer Inst 92: 690-8 (2000)
- 67.- De Villiers M et al " Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas" Int J Cancer 36: 575-8 (1985)
- 68.- Ibieta BR – Lizano M " Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population" Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99(3): 311-5(2005)
- 69.- Syragen S "Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer" J Clinical Virol 32:59-66(2005)+
- 70.- Ha PK Califano JA " The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis " Crit Rev Oral Biol Med 1: 15(4):188-96 (2004)
- 71.- Lo Muzio et al " HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis ; a relationship? Oral Oncol 40(7):736-41
- 72.- Remmerbach TW, Punke C "PCR detection of human papillomavirus of the mucosa; comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets" J Clinical Virol 30(4):302-8(2004)
- 73.- Correnti m et al "Detection of human papillomavirus of high oncogenic potencial in oral squamous cell carcinoma in Venezuela population" Oral Dis 10(3):163-6 (2004)
- 74.- Cao J Zhang et al "Advances in molecular biological study of HPV infection and oral cancer" 10 (3);273-5 (2001)
- 75.- Gallegos HJF "Epidemiología, prevención y diagnóstico oportuno del cáncer de vías aerodigestivas superiores (VADS) Act med Gpo Ang 3(4):247-254 (2005)
- 76.- Lawton et al "Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection". J. Oral Pathol Med;21:265-69(1992)
- 77.- Lorincz A ."Molecular methods for detection of human papillomavirus infection". Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.;23:707-715. (1996)

DETERMINACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE VÍAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

78.- Chang KW et al. "High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan" J Med Virol 28(1):57-61 (1989)

79.- Watts et al. "Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck" Oral Surg Oral Med Oral Pathol Jun;71(6):701-7.(1991)

80.- Miller CS "Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization" May;77(5):480-6(1994)