



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DETECCIÓN DE VPH-16, EBV Y CMV EN CARCINOMA
ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MAYRA XIMENA MONGE HUERTA

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESORES: Mtra. CARLA MONTSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS



“...es evidente que cada uno de nosotros podría elaborar una lista de personas que han influido en su vida de manera tan significativas y profundas que se escapan a cualquier intento de descripción; personas que han compartido su saber, mostrado su verdad, sobrellevado nuestros defectos y debilidades con paciencia infinita, y nos han contemplado descubriendo en cada uno lo mejor que había. Personas que, tanto al aceptarnos como al negarse a aceptar aquella parte de nosotros que sabían que realmente no queríamos, nos han hecho crecer.”

Conversaciones con Dios. Neale Donald Walsh

Agradezco a Dios y a la vida, por permitirme cumplir un sueño tan grande. Posicionarme en el lugar y momento adecuado a lo largo de este camino, pero sobre todo por poner a tantos ángeles en mi andar. Por llenarme de enseñanzas y mucha luz.

A mi eterno ángel guardián Lulú, por hacerse sentir en TODO momento presente. Por guiarme e iluminarme, y enseñarme que el amor eterno y verdadero, si existe.

A mi padre Max, por su esfuerzo y enseñanza infinita. Por mostrarme con el ejemplo el trabajo, el compromiso, el amor y que lo más importante siempre será la familia. Te amo, respeto y admiro infinitamente.

A Ana Lilia, por decidir ser mi madre y todas las responsabilidades que esto conlleva. Por mostrarme la enorme fuerza, bondad y amor que puede haber en un ser humano; por cuidarme, llenarme de amor y consejos siempre.

A mi hermana Alejandra, por ser mi compañera de vida y caminar a mi lado siempre. Por ser, estar y mostrarme que siempre hay que luchar por lo que me hace realmente feliz.



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS



A mis colegas y mejores amigas, Damaris y Valeria. Por permanecer a mi lado en este largo y duro camino, por tantas aventuras y enseñanzas; por ser mis hermanas, llenarme de felicidad y mucho amor siempre. Porque solo nosotras sabemos por todo lo que hemos pasado juntas.

A mis primos Luis e Ivette; por creer en mí, brindarme tantas oportunidades, enseñanzas y motivarme siempre para seguir adelante por mis sueños. Los quiero y admiro profundamente.

A mi mejor amigo Ángel, por ser sincero e incondicional para mí siempre, apoyarme, motivarme y guiarme todo este tiempo.

A mis amigos Martín, Sara y Juan por compartir desde el inicio este camino y ser la felicidad constante que me acompaña día a día.

A mi hermana Laura, por creer en mí y por darme a la luz de mis ojos; mis sobrinos Ángel y Yiyi porque siempre me muestran el amor más puro e incondicional que puedo tener.

A mi tutor el Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán, por la enorme paciencia, dedicación, pasión, tiempo y esfuerzo dedicado para elaborar este trabajo. Pocos profesores como usted he encontrado a lo largo de mi vida y agradezco infinitamente todo lo brindado. Al igual que a la Mtra. Carla Montserrat Ramírez Martínez por compartir su conocimiento, dedicar su valioso tiempo y orientarme para finalizar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, es especial a la Facultad de Odontología; por brindarme tantas oportunidades y la mejor preparación posible sin pedir nada a cambio.

¡Gracias vida por tanto!



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1. Definición.....	8
1.2. Epidemiología.....	8
1.3. Patogenia	9
1.4. Etiología y factores de riesgo	13
1.5. Virus con potencial oncogénico.....	17
1.6. Virus de papiloma humano.....	22
1.6.1. Estructura de VPH.....	22
1.6.2. Transmisión de VPH.....	24
1.6.3. Replicación de VPH.....	24
1.6.4. Fisiopatogenia de VPH.....	24
1.6.5. Mecanismo oncogénico de VPH.....	26
1.7. Virus de Epstein- Barr.....	28
1.7.1. Estructura de VEB.....	28
1.7.2. Fisiopatología de VEB.....	29
1.7.3. Mecanismo oncogénico VEB.....	31
1.8. Citomegalovirus.....	32
1.8.1. Estructura de CMV.....	32
1.8.2. Fisiopatología de CMV.....	33



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS



1.8.3. Mecanismo oncogénico.....	33
1.9.Características clínicas	35
1.10.Histopatología.....	37
1.11.Pronostico	41
1.12.Tratamiento	41
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
3. OBJETIVO	43
4.JUSTIFICACIÓN	44
5.MATERIALES Y MÉTODOS	45
5.1.Materiales y equipo	45
6.RESULTADOS	51
7. DISCUSIÓN	56
8. CONCLUSIÓN	58
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59



INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna de origen epitelial más común en cavidad bucal y constituye una enfermedad destructiva de cabeza y cuello capaz de infiltrar e invadir tejidos a distancia.

Estadísticamente supone el 90% de los cánceres orales y del 2 - 5% en todas las neoplasias. El GLOBOCAN estimó 300,373 nuevos casos en 2012, por lo cual se ha convertido en un problema de salud pública mundial.

El COCE se encuentra estrechamente relacionado con hábitos nocivos, principalmente el tabaquismo y consumo de alcohol; factores de riesgo cuya incidencia ha comenzado a homogenizarse entre ambos géneros, lo cual ha propiciado que la prevalencia de COCE en mujeres vaya en aumento.

Sin embargo, en la última década se han diagnosticado más pacientes que no presentan los típicos factores de riesgo, con lo que se ha iniciado la expansión en la búsqueda de factores etiopatogénicos asociados al COCE. Como resultado de esta indagación se han hallado varios posibles cofactores, cuya presencia repercute directa o indirectamente en el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo que resulta particularmente interesante, y que ha sido reportado en distintas publicaciones dándole validez y credibilidad, es el potencial oncogénico observado en algunos virus, específicamente el subtipo 16 del virus de papiloma humano, virus de Epstein - Barr y Citomegalovirus, los cuales serán el centro de esta investigación.

Identificar la presencia de uno o más de estos virus en las muestras que han sido utilizadas en este estudio, permitirá describir una potencial correlación



**DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS**



con el carcinoma oral de células escamosas; lo que significaría un argumento que justifique la inclusión de estos virus como factor de riesgo en la enfermedad.



1.MARCO TEÓRICO

1.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud define el carcinoma oral de células escamosas como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y propensa a metastatizar hacia los ganglios linfáticos en estadio temprano. ¹

El COCE es una neoplasia maligna que se origina de las células escamosas del epitelio que recubre la mucosa. Se presenta frecuentemente entre la quinta y sexta década de vida; los principales factores de riesgo están relacionados con el tabaquismo y consumo de alcohol. ²

Su localización se encuentra bien establecida y existen diferentes estudios donde se reporta de la siguiente manera en orden descendente a su frecuencia de aparición: lengua (bordes laterales y superficie ventral), piso de boca, encía, labio, paladar y el resto de las estructuras anatómicas de la boca aparecen con baja frecuencia.³

1.2. Epidemiología

El COCE es la neoplasia más frecuente en la cavidad oral, ya que representa aproximadamente el 90% de las neoplasias en cavidad bucal, el 5% de todas las neoplasias y ocupa el número 12 de las neoplasias malignas en el mundo. ^{1,3}

La cantidad de casos de neoplasias se ha incrementado en la última década y se esperan 15 millones de nuevos casos para el año 2020 a nivel mundial.



En México, el carcinoma oral de células escamosas es el tipo de neoplasia maligna más frecuente en cavidad bucal, ya que su incidencia representa entre el 1% y el 5% del total de las neoplasias malignas.

En 2012, GLOBOCAN informó que existen 148 000 casos nuevos de cáncer, de los cuales 2 791 corresponden a cáncer oral en México⁴ ; lo que muestra un aumento en la incidencia de este tipo de cáncer.

En México, entre 1979 y 2003, el número de muertes debidas a cáncer oral fue de 15 579, por lo que actualmente es considerado un problema de salud pública.¹

Un diagnóstico precoz es de suma importancia, ya que los estadios iniciales de cáncer bucal permiten un tratamiento menos agresivo y, por lo tanto, disminuye la morbilidad. Debido a la detección tardía, el 25% de los casos de cáncer de boca son mortales. Predomina en los varones en proporción 2:1 con respecto a las mujeres. Sin embargo, a nivel mundial existen informes de una leve disminución en la tasa de cáncer oral en hombres y aumento en las mujeres.³

1.3. Patogenia

Protooncogenes y genes supresores tumorales.

Las células del organismo, reguladas por un complejo sistema de señales bioquímicas, están programadas genéticamente para desarrollarse, diferenciarse y morir. El cáncer se origina a partir de una célula que forma un clon que carece de restricciones de las células originales, y es capaz de proliferar inapropiada e incontroladamente. Se produce así una masa denominada neoplasia, que según su capacidad de crecimiento o invasión, puede ser clasificada como benigna o maligna.



En términos generales, puede decirse que cada célula normal posee una serie de genes que controlan las funciones del crecimiento y las divisiones celulares. Un tumor surge cuando uno de ellos muta o se altera independientemente. De acuerdo con ello, los procesos tumorales están regulados por cuatro tipos de genes: los protooncogenes, los oncogenes, los antioncogenes y los mutadores.

Se define a los *oncogenes* como un tipo de gen capaz de provocar cáncer; la mayoría de ellos se origina a partir de *protooncogenes*, los cuales son componentes normales del genotipo que codifican proteínas implicadas en el crecimiento y diferenciación celular.⁵

En el cromosoma de la célula normal, existen genes implicados en los procesos de crecimiento, maduración y proliferación celulares que reciben el nombre de protooncogenes. Las funciones de estos, están estrechamente ligados a fenómenos esenciales del correcto comportamiento celular; en algunas circunstancias los protooncogenes sufren alteraciones que modifican su función normal y la dotan de capacidad transformante, función realizada por los oncogenes, los cuales pueden residir desde el inicio del cromosoma celular o integrarse en el genoma de la célula procedentes del exterior, vehiculizados por un virus.⁶

Un oncogén es un gen que induce un proceso de transformación celular. En algunos casos, los oncogenes están incluidos en el propio genoma viral y a estos microorganismos se le conoce como *virus oncogénicos*.

El proceso de oncogénesis puede deberse a diversos factores que básicamente son:



*Una mutación, generalmente por exposición a un mutágeno químico o una radiación.

*Transducción de protooncogenes por un virus que podría liberarlos de los controles celulares normales y quedar bajo el control de proteínas reguladoras víricas.

*Translocación de oncogenes de un locus cromosómico a otro no sujeto a mecanismo de regulación normal.

*Amplificación de genes que incrementan en grandes cantidades diversos productos oncogénicos.

*Integración del genoma vírico con o sin oncogenes en un protooncogén.

**Mecanismo de activación de los oncogenes*

Existen diversos procesos por los cuales un gen puede activarse de forma anormal, activando mecanismos de transformación celular.

**Transducción vírica*

Un paso fundamental del ciclo infectivo de dichos virus es una integración en el cromosoma celular. La caracterización de las secuencias genéticas de los retrovirus integrados (provirus) ha permitido comprobar que estos se parecen considerablemente a elementos genéticos celulares llamados transposones, que se mueven de una posición a otra en el cromosoma celular y que tienen la capacidad para alterar y modificar la expresión de los loci genéticos en los que se insertan. Así, la aparición de un tumor puede ser consecuencia de la integración de un provirus en las proximidades de un oncogén.⁵



*Activación de oncogenes por mutagénesis insercional

Se define como una alteración resultante de la inserción de secuencias extrañas de DNA en un locus genético concreto. La inserción de un provirus o la transposición de elemento genéticos móviles (transpones) que interrumpen las secuencias genéticas normales de la célula huésped constituyen fórmulas de mutagénesis insercional.

*Activación de oncogenes por reordenamiento/translocación cromosómica

Como consecuencia del fenómeno de translocación, un protooncogén celular ubicado en un determinado cromosoma puede localizarse en una nueva situación interactuando con genes celulares vecinos.

*Activación por amplificación genética

Se define por la presencia de múltiples copias de un gen simple de un cromosoma celular; la consecuencia inmediata de la amplificación es el aumento de la expresión de este gen con el consiguiente incremento de la cantidad de proteína que codifica.

En estudios de tumores que poseen oncogenes amplificados, se ha demostrado que la presencia de múltiples copias de secuencias de ácidos nucleicos se relaciona con peores pronósticos de la enfermedad.

*Activación por mutación puntual

Caracterizada por la sustitución simple de una base de un nucleótido, lo que lleva aparejado el cambio de un aminoácido en la proteína codificada por el oncogén que adquiere propiedades funcionales nuevas y diferentes en el mecanismo celular.⁵



*Activación por interacción proteína- proteína

Determinados oncogenes, sobre todo los incluidos en la carga genética de virus DNA, ejercen su actividad transformante a merced de la interacción de las proteínas que codifican con proteínas celulares, con la consiguiente alteración de la función biológica normal de estas.

Entre los oncogenes más estudiados del carcinoma oral de células escamosas, se encuentran los miembros de la familia myc, los de la familia ras y algunos genes supresores tumorales o antioncogenes. De igual manera, en algunos carcinomas epidermoides se ha detectado un aumento en los productos codificados por los oncogenes c-myc y c-ras, lo que implicaría, alguna relación entre la activación anormal de dichos oncogenes y el desarrollo del cáncer. ⁵

1.4. Etiología y factores de riesgo

La Organización Mundial de la Salud en el año 2010 define factor de riesgo como “cualquier rasgo, característica o exposición del individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión” y define carcinógeno como “sustancias o elementos que bajo su exposición pueden inducir mutación en el ADN celular y generar cáncer”. ⁷

En la aparición y desarrollo de cáncer oral se han implicado diferentes factores carcinogénicos que ejercen sus influencias por mecanismos de inicio o de promoción.

Dentro de los mecanismos globales de carcinogénesis se conocen dos fases o periodos; un periodo de iniciación, en los que actuarían los factores de transformación neoplásica; algunas células normales o su progenie se



convierten, en un tiempo relativamente corto y por la acción de un agente carcinógeno, en células tumorales latentes.

La segunda fase es un periodo de promoción, en el que se posibilitaría que el tipo celular transformado entrara en situación de crecimiento celular tolerado. En ocasiones existen factores de inicio y promoción distintos, también en otras un mismo agente carcinógeno actúa como iniciador y promotor a la vez.^{6,8}

La International Agency for Research on Cancer (IARC) clasifica los carcinógenos en:

- Grupo 1: Carcinógenos para humanos.
- Grupo 2A: Probablemente carcinógenos para humanos.
- Grupo 2B: Posiblemente carcinógenos para humanos.
- Grupo 3: No es posible de clasificar como carcinógeno para humanos.
- Grupo 4: Probablemente no carcinógeno para humanos.⁹

Se han mencionado diversos factores de riesgo asociados, como son el tabaquismo, alcoholismo, sífilis, infecciones por virus, liquen plano bucal, irritantes mecánicos, higiene bucal deficiente, factores hereditarios, entre otros.

Existen discrepancias entre factores de riesgo y su supervivencia por raza, edad, género, sitio anatómico y exposición a sustancias carcinogénicas. Es de relevancia conocer la importancia que tienen estos, así como determinar los agentes causales y asociados a una conducta biológica.²



La etiología del COCE es multifactorial, siendo los factores de riesgo más importantes el consumo de alcohol y tabaco, los cuales aumentan sinérgicamente el riesgo hasta en un 50%.²

Tabaco

El papel del tabaco ha sido merecedor de una considerable atención, existiendo bastantes pruebas para que pueda considerársele como agente de intervención responsable en la producción de COCE.

Varios estudios prospectivos y retrospectivos han demostrado que los fumadores empedernidos tienen un riesgo considerablemente mayor que los no fumadores para la aparición de carcinoma oral. Asimismo, existen pruebas considerables para asociar el carcinoma oral con el uso prolongado de rapé (principalmente en Suecia y región sudamericana) y tabaco de mascar.⁶

Alcohol

El consumo excesivo de alcohol ha sido uno de los principales factores asociados a carcinoma oral. En el estudio de Wynder y colaboradores, el 33% de los hombres con COCE admitieron beber más de un cuarto de litro diario de whisky, mientras que solo el 12% del grupo control recurriría al alcohol en citada cantidad.

Muchos clínicos que han estudiado el cáncer han comprobado que los pacientes con cáncer oral son propensos a ser grandes bebedores.⁸

El alcohol, al igual que el tabaco, parece actuar como factor iniciador y promotor a la vez. El riesgo de aparición de carcinoma se incrementa con el mayor consumo de bebidas alcohólicas. Sin embargo, parece que no existe



relación con el tipo de bebida, más bien, dependerá del contenido de alcohol de estas.

Asimismo, se ha relacionado la influencia de algunos colutorios comercializados que tienen un contenido de alcohol del 14-18%. Weaver et al. en un estudio sobre 200 pacientes con cáncer oral, comprobaron que 11 habían utilizado colutorios con contenido alto en alcohol varias veces al día durante muchos años, no siendo bebedores de alcohol.

Es interesante resaltar el hecho de que en muchas ocasiones se encuentran asociados el alcohol y el tabaco en un mismo paciente, con lo que el riesgo de desarrollo de un cáncer oral se incrementa en gran medida. ⁶

Irritación por dientes o prótesis

En este punto existe una gran controversia, pues, mientras para algunos autores hay una evidente relación causa-efecto entre estos factores y el cáncer oral, otros lo niegan debido a que no se ha presentado evidencia suficiente para considerarlo como carcinogénico.

Por lo tanto, para algunos autores no existe relación topográfica entre la irritación provocada por dientes rotos o con bordes afilados o bien prótesis mal adaptadas, y, en el caso de que existiera, sería simple coincidencia. Sin embargo, otros encuentran en un elevado porcentaje de casos una clara relación entre ambos.

La gran frecuencia entre estos factores irritantes entre la población en general, hace que, a pesar de todo, su papel resulte difícil de valorar.



Virus

Los virus son los agentes infecciosos más pequeños (tamaño oscila entre 20-300 nm de diámetro) y contienen un solo tipo de ácido nucleico (RNA o DNA) en su genoma. El ácido nucleico se encuentra rodeado por una cubierta proteínica; está envuelto por una membrana constituida por lípidos. La unidad infecciosa en conjunto se denomina virión.

Los virus son parásitos a nivel genético y muestran replicación solo en células vivas, pues son inertes en el entorno extracelular.¹⁰

Últimamente ha adquirido gran importancia su posible influencia en la etiología del cáncer oral gracias a estudios inmunológicos y a técnicas de hibridación. En la actualidad dos son los virus que más profundamente se está investigando su posible relación en la transformación de células epiteliales a cancerosas: el virus del herpes simple (VHS) y el virus de papiloma humano (VPH).⁶

1.5. Virus con potencial oncogénico

Hace relativamente poco tiempo no estaba demostrada la etiología vírica de los procesos tumorales, pero hoy en día un número importante de ellos ha sido relacionado con determinados virus.

Cuando un virus infecta una célula, su genoma puede integrarse en el de la célula produciendo fenómenos de transformación y, por consiguiente, neoplasias.

En este caso, sobrevienen alteraciones del crecimiento, cambios morfológicos, metabólicos, anomalías cromosómicas e incluso alteraciones



del tipo inmunitario con la aparición de nuevos antígenos, bien del propio virus o de la célula.

El mecanismo por el cual los oncogenes celulares se relacionan con retrovirus, se puede explicar por dos mecanismos:

*Por recombinación del ARN genómico vírico y los ARN mensajeros de la célula.

*Por el proceso de integración de virus no transformante en las proximidades de un protooncogén y su posterior fusión de secuencias. ⁵

Los virus son factores etiológicos en el desarrollo de diversos tipos de tumores en el ser humano; cuando menos 15- 20 % de todos los tumores humanos a nivel mundial tienen causa viral.

Los estudios con virus de RNA oncogénicos revelaron la participación de oncogenes celulares en las neoplasias; los virus de ADN oncógenos permitieron establecer la participación de los genes supresores de tumores celulares.

Los virus oncogénicos se clasifican en diversas familias en función del ácido nucleico de su genoma y las características biofísicas de sus viriones. La mayor parte de los virus oncogénicos conocidos poseen un genoma de DNA o genera un provirus de DNA después de infectar a las células.

Los virus de DNA oncógenos se clasifican dentro de los grupos papiloma, polioma, adeno, herpes, hepadna y poxvirus; codifican oncoproteínas virales que son importantes para la replicación viral, pero también repercuten en las vías que regulan la proliferación celular. La mayor parte de los virus RNA oncogénicos pertenecen a la familia retrovirus.



Durante la carcinogénesis, se requieren múltiples cambios genéticos para convertir a una célula normal en una maligna. Se trata de un proceso de evolución celular en el que quizá participa la inestabilidad genética celular y la selección repetitiva de células raras con cierta ventaja de crecimiento selectivo.

Al parecer el virus oncógeno actúa por lo general como cofactor, proporcionando únicamente algunos de los pasos necesarios para generar células malignas. Los virus son necesarios, pero no suficientes para la formación de tumores de causa viral. Con frecuencia actúan como iniciadores del proceso neoplásico, a través de diversos mecanismos.¹⁰

**Oncogenes celulares*

Los mecanismos moleculares responsables de la activación y conversión de un protooncogén benigno en un gen cancerígeno, varían, pero todos ellos conllevan daño genético. Dicho gen puede ser sobreexpresado, y en consecuencia se puede presentar un efecto importante de la dosis de la proteína sobreproducida del oncogén en los cambios del crecimiento celular.

Estos mecanismos pueden dar como resultado la activación constitutiva, por lo que el gen se expresa en un momento inadecuado durante el ciclo celular o en tipos de tejidos no apropiados.

La inserción de un promotor retroviral adyacente a un oncogén celular puede ocasionar un aumento de la expresión de dicho gen. La expresión de un gen celular también puede aumentar por la acción de secuencias “aumentadoras” virales cercanas.¹⁰



**Genes supresores de tumores*

Durante la activación de tumores participa un segundo tipo de genes de cáncer humano; estos corresponden a los reguladores negativos del crecimiento celular, los genes supresores de tumores. Se requiere de la inactivación o la pérdida funcional de ambos alelos de tales genes para que se forme el tumor, contrario a la activación que ocurre en los oncogenes celulares.

Uno de los genes supresores cruciales es el gen p53, que bloquea la progresión del ciclo celular; actúa como un cofactor de transcripción y regula la síntesis de una proteína que inhibe la función de ciertas cinasas que regulan el ciclo celular. También ocasiona que las células que sufren daño en el DNA progresen a apoptosis. La pérdida de la función de p53 permite que las células avancen en el ciclo celular a pesar de que hayan sufrido daño en el DNA, lo que eventualmente conduce a la acumulación de mutaciones genéticas.¹⁰

Interacción de virus oncogénicos con sus hospederos

**Infecciones persistentes*

A causa de una serie de diferencias en la susceptibilidad genética y respuesta inmunitaria individual, la magnitud de la multiplicación viral y los tropismos hásticos pueden variar entre las personas.

La cronicidad de la infección presenta una oportunidad prolongada para que se produzca un evento raro que permita la supervivencia de una célula con mecanismos reguladores de la proliferación que son modificados por virus.



*Respuesta inmunitaria del hospedero

Los virus que establecen infecciones persistentes deben evitar ser detectados y reconocidos por el sistema inmunitario, el cual podría eliminar la infección.

Se cree que los mecanismos inmunitarios de vigilancia del hospedero, eliminan por lo general a las pocas células neoplásicas que se originan en las personas sanas que sufren una infección por virus oncógeno. Sin embargo, cuando el hospedero padece inmunodepresión, es probable que las células neoplásicas proliferen y escapen al control inmunitario.

*Mecanismo de acción de virus oncógenos

Los virus oncógenos controlan una serie de cambios de conducta celular a través de una cantidad limitada de información genética. Esto se logra por medio de dos patrones generales, el virus oncógeno introduce un “gen transformante” nuevo en la célula o bien el virus modifica la expresión de uno o varios genes celulares preexistentes.

En cualquiera de los dos casos, la célula pierde el control de la regulación y proliferación normal. A menudo se modifican las vías de reparación del DNA, lo que provoca inestabilidad genética y un fenotipo mutágeno.

*Susceptibilidad celular a las infecciones y transformación viral

A nivel celular, las células del hospedero son permisivas (las cuales ayudan a la replicación viral y la producción de una progenie viral) o no permisivas para la replicación de determinado virus.¹⁰



Especialmente con los virus DNA, las células permisivas a menudo son aniquiladas por la replicación viral y no se transforman a menos que se bloquee de alguna manera el ciclo de replicación viral que provoca la muerte de la célula hospedera; las células no permisivas se pueden transformar.

Una propiedad característica de los virus RNA oncógenos es que no son letales para las células en las que se multiplican. Las células que son permisivas para un virus pueden ser o no permisivas para otro.

No todas las células del hospedero natural son susceptibles a la replicación, transformación viral o ambas.

*Retención del ácido nucleico del virus oncógeno en una célula hospedera

La transformación genética estable de una célula normal en una neoplásica por lo general requiere de retención de genes virales en la célula. Con frecuencia, esto se logra por medio de la integración de determinados genes virales en el genoma de la célula hospedera.

En determinados sistemas virales, las células transformadas por virus pueden liberar factores de crecimiento que modifican el fenotipo de las células vecinas no infectadas, contribuyendo de esta manera a la formación de tumores. ¹⁰

1.6. Virus de papiloma humano

1.6.1. Estructura de VPH

El virus de papiloma humano (VPH) forma parte de un grupo de virus ADN heterogéneo llamado papillomaviridae; es causante de múltiples lesiones hiperplásicas, verrucosas y papilomatosas de células epiteliales de piel y mucosas. Tiene un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro. Su única



molécula de ADN de doble cadena, presenta aproximadamente 8000 pares de bases y codifica ocho regiones de lectura abierta (ORF: open Reading frame), regiones tempranas (E), y tardías (L), encargadas de regular la síntesis proteica temprana representada por E1, E2, E5, E6, E7; y las tardías L1 y L2; según como se realiza la expresión en el ciclo de vida del virus.^{11,12}

Su cápside forma un icosaedro constituido por dos proteínas: la mayor de la cápside (L1) y la proteína menor de la cápside (L2). La proteína L1 contiene toda la información necesaria para el ensamblaje de la cápside y la proteína L2 se une al ADN viral para permitir su encapsidación.¹³

El genoma del VPH está dividido en tres regiones: una región reguladora no codificada, denominada región larga control (LCR), una región que incluye genes de expresión temprana y una región que contiene genes de expresión tardía. Se han identificado más de 100 tipos de VPH y más de 20 tipos asociados a infecciones en humanos, subdivididos en alto riesgo, riesgo intermedio y riesgo bajo.¹² Figura 1

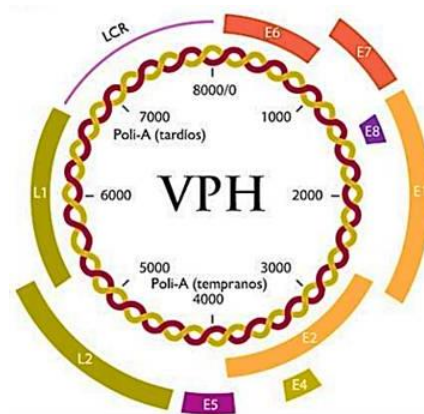


Figura 1: Representación simplificada del genoma de VPH. Es una molécula de ADN circular de doble cadena, dividida en tres regiones, región larga de control (LCR), región temprana que contiene a los genes E1 a E8 y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2 los cuales constituyen la cápside.¹⁴



1.6.2. Transmisión de VPH

La transmisión del VPH se da generalmente por el contacto directo permitiendo así su transferencia entre las células epiteliales; las vías de transmisión pueden ser: por contacto sexual (tomando importancia el número de parejas sexuales), por sangre, vía perinatal o por autoinoculación. Una posible transmisión del virus por medio de la saliva ha sido sugerida también por algunos autores.^{11,12}

1.6.3. Replicación de VPH

El VPH principalmente penetra al huésped por abrasiones el epitelio estratificado plano de la lengua, donde inicia su ciclo infectando a las células poco diferenciadas del epitelio y ahí comienza la transcripción de sus genes.

Hay dos ciclos para la replicación viral; uno es la infección lítica en la que el virus llega a las células parabasales con mucha capacidad de replicación, se introduce en el citoplasma y posteriormente en el núcleo; y la infección lisogénica aquí se ve afectado directamente el genoma celular, tal es el caso del VPH de alto riesgo 16 y 18 respectivamente. Al alcanzar el núcleo celular el virus se integra al genoma de la célula huésped, primordialmente con los segmentos E6 Y E7.¹²

1.6.4. Fisiopatología de VPH

El queratinocito es el hospedador del VPH, y el ciclo de infección se encuentra relacionado a la diferenciación del mismo. El virus penetra las células supra basales del epitelio cervical, y produce por transcripción los inmuno-genes que le permiten alterar el sistema inmune de vigilancia del hospedador, con lo que se inicia el proceso de la infección. Hay factores



importantes en la resistencia del huésped como la inmunidad celular y la inmunidad innata, esto es sugerido por el infiltrado de las células T y la necrosis celular, que se observan en el lugar de regresión de las verrugas, así como la participación de las células presentadoras de antígenos y la estimulación de citoquinas pro inflamatorias.¹²

Una vez interiorizadas en las células, las partículas virales pierden su cápside y penetran en el núcleo. El ADN viral aprovecha las capacidades de división de las células basales y se duplica a la vez que el genoma celular, después se transmite a las células hijas, donde se mantiene en forma episómica. Esta etapa inicial de la infección está controlada por los genes precoces E1 y E2.

Cuando estas células abandonan la capa basal, para que se produzca la renovación del epitelio, dejan naturalmente de dividirse y comienzan un proceso de diferenciación terminal.

La continuación del ciclo por parte de estas células, se consigue gracias a las proteínas virales E6 y E7, que son producidas en cantidades estrictamente controladas en capas profundas e intermedias del epitelio. Estas proteínas inhiben, estrictamente, las proteínas p53 y pRb, dos factores clave en la regulación del ciclo celular. Esta etapa es la fase proliferativa de la infección, durante la cual el VPH amplifica su genoma y el número de células infectadas aumenta. Durante esta fase puede manifestarse clínicamente por la aparición de lesiones (condilomas, etc.).

Al final de la fase proliferativa, el genoma viral se encapsida. Las células cargadas de viriones son reconocibles por la presencia de inclusiones virales, denominadas coilocitos, que son patognomónicas de la infección por VPH.



La salida de las partículas virales se produce por descamación, cuando se elimina la capa cornea superficial. Este mecanismo, que no provoca una reacción inflamatoria, interviene en las distintas estrategias desarrolladas por el VPH para limitar, al máximo, su contacto con células inmunitarias.

De este modo, la mucosa es muy infectante y el riesgo de transmisión muy elevado. La duración de la infección productiva es variable y depende de la respuesta inmunitaria. Los papilomavirus, pueden resistir muchos años en un estado latente en el interior de algunas células de la capa basal y reactivarse secundariamente, sobre todo en caso de inmunodepresión.¹³

1.6.5. Mecanismo oncogénico de VPH

En el seno de la región denominada precoz, tres proteínas (E5, E6, E7) tienen un potencial cancerígeno en los VPH oncogénicos. Las oncoproteínas E6 y E7, debido a que carecen de actividad enzimática propia, ejercen sus funciones asociándose a muchas proteínas de la célula huésped.

**Oncoproteína E6*

Tiene numerosas dianas en el interior de la célula infectada. La interacción que mejor se ha caracterizado corresponde a la proteína p53; la cual es un factor de transcripción que regula la expresión de muchos genes implicados en el control del ciclo celular, la reparación del DNA, la apoptosis y la senescencia.

La interacción entre E6 y p53, se realiza principalmente a través de la proteína E6AP, la cual es capaz de formar un complejo entre E6 y p53, lo que da lugar a la ubiquitinación de este complejo y a su degradación por el proteasoma.



E6 también puede interactuar con p53 mediante otros mecanismos.

La inhibición funcional de p53, que solo es posible en los VPH oncógenos, tiene consecuencias importantes para la célula. La función principal de esta proteína es vigilar la integridad celular. Si se detecta alguna anomalía, puede detener el ciclo celular para reparar los daños o causar la muerte de la célula si las alteraciones no son reparables.

La inactivación de p53 impide la apoptosis provocada teóricamente por la síntesis no programada de ADN, después del reinicio del ciclo de las células infectadas por E7.

La inhibición de la apoptosis por E6 favorece la aparición de un estado de inestabilidad genómica y cromosómica, marcada por la aparición de anomalías genéticas que no pueden controlarse por los mecanismos de reparación dependiente de p53. Estas alteraciones pueden contribuir a la oncogénesis.¹³

*Oncoproteína E7

La principal acción de E7 consiste en hacer que las células diferenciadas del epitelio entren en ciclo celular para asegurar la replicación del genoma viral y las síntesis de estas proteínas.

Entre las distintas alteraciones inducidas por E7, las relacionadas en las interacciones con los miembros de las proteínas Pocket (principalmente pRb) son esenciales. La proteína supresora tumoral pRb es clave en la regulación del ciclo celular.

Esta proteína, se une a factores de transcripción de la familia E2F y provoca su inhibición. La inactivación de estos factores de transcripción se opone a la



expresión de estos genes necesarios para pasar de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y por tanto, a la replicación del ADN celular y por extensión, del ADN viral.¹³

1.7. Virus de Epstein- Barr

1.7.1. Estructura de EBV

Es un herpesvirus ubicuo que es el agente causal de la mononucleosis infecciosa aguda y está estrechamente relacionado con carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.⁵

Está constituido por una molécula de ADN bicatenario de una longitud aproximada de 172 kb que codifica aproximadamente unas 100 proteínas. La molécula de ADN está flanqueada en ambos extremos por un número variable de repeticiones terminales, cada una de ellas de una longitud aproximada de 500 pb. Hay dos tipos principales de EBV (A y B).^{5,15} Figura 2

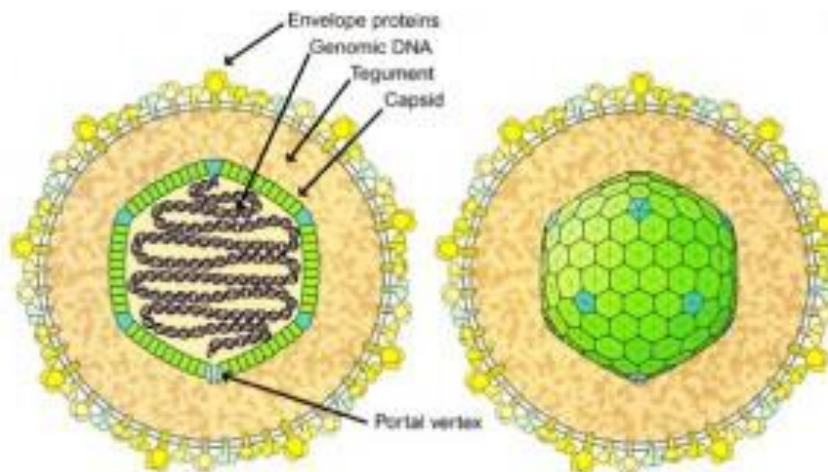


Figura 2: Estructura del virus de Epstein- Barr¹⁶



1.7.2. Fisiopatología y replicación de EBV

La principal célula infectada por el EBV es el linfocito B, en los cuales se pueden establecer estirpes celulares continuas, lo cual indica que las células han sido inmortalizadas por el virus.

El EBV inicia la infección de los linfocitos B al unirse al receptor viral, que es el receptor para el componente C3d del complemento (CR2 o CR21). Entra de manera directa a un estado latente en el linfocito sin experimentar un periodo de replicación viral completa. Las características distintivas de la latencia son la persistencia viral, la expresión restringida del virus y el potencial de reactivación y replicación lítica.

La eficacia de la inmortalización del linfocito B por EBV es muy alta; cuando el virus se une a una superficie celular, las células se activan para ingresar al ciclo celular. Después, se expresa una gama limitada de genes de EBV y las células pueden proliferar por tiempo indefinido. El genoma de EBV lineal forma un círculo y se amplifica durante la fase S del ciclo celular; la mayor parte del DNA viral en las células inmortalizadas existe como episomas circulares.

Los linfocitos B inmortalizados por EBV expresan diferentes funciones, como la secreción de inmunoglobulina. Los productos de la activación de los linfocitos B también se expresan.

En un determinado momento, muy pocas células en una población inmortalizada liberan partículas virales. La latencia se altera y el genoma de EBV se activa para replicarse en una célula por diversos estímulos, como las sustancias químicas activadoras o el entrecruzamiento con las inmunoglobulinas de la superficie celular.



El EBV puede producir diversos trastornos linfoproliferativos. La expresión del gen viral en estas células es limitada y varía desde solo EBNA1 hasta el complemento completo de proteínas que se encuentran en los linfocitos B con infección latente.⁵

Antígenos virales

Los antígenos virales de EBV se dividen en tres clases, con base en la fase del ciclo vital del virus en la que se expresan:

- 1) Los antígenos de la fase latente se sintetizan en las células con infección latente; estos comprenden los EBNA y los LMP. Su expresión revela que hay un genoma de EBV.
- 2) Los antígenos iniciales son proteínas no estructurales cuya síntesis no depende de la replicación viral de DNA viral; la expresión de los antígenos iniciales indica la presencia de replicación viral productiva.
- 3) Los antígenos tardíos son los componentes estructurales de la cápside viral y la envoltura viral. Se produce de manera abundante en la célula sometida a la infección viral productiva.

**Infección primaria*

Suele transmitirse por saliva infectada e inicia una infección en bucofaringe. La replicación viral ocurre en las células epiteliales de la faringe y las glándulas salivales. Los linfocitos B infectados difunden la infección desde la bucofaringe hasta todo el organismo.



**Reactivación a partir de la latencia*

Se pueden presentar reactivaciones de las infecciones latentes por EBV, según se pone de manifiesto por un incremento de las concentraciones del virus en la saliva y en el DNA de los eritrocitos, lo cual puede ser asintomático desde el punto de vista clínico. Se sabe que la inmunosupresión reactiva la infección, a veces con consecuencias graves.⁵

1.7.3. Mecanismo oncogénico de EBV

El virus de Epstein- Barr es un virus linfotrópico que, es capaz de permanecer en el tejido linfoide y de tener capacidad oncógena, ya que algunas de las proteínas que codifica pueden alterar la regulación del crecimiento celular.

Al contrario de lo que sucede con el virus de papiloma humano, no parece que el EBV inactive a los genes supresores de tumor. Mas bien, estimula la expresión de ciertos antígenos víricos en las células. Efectivamente, el desarrollo de tumores en personas inmunodeprimidas se relaciona con ocho de los cien genes que codifica el virus.

Estos ocho genes codifican seis antígenos nucleares (EBNA) y dos proteínas latentes de membrana (LMP). Uno de los EBNA, el 2, y uno de los LMP-1, induce la activación de los linfocitos y la proliferación celular.

En el caso del carcinoma nasofaríngeo, existe una integración clonal, así como elevación de anticuerpos frente a los antígenos de la cápside vírica. En el desarrollo de linfomas de células B en sujetos inmunodeprimidos, a expresión de antígenos víricos como LMP-1 permanece aumentada.



La observación de que algunos procesos tumorales regresan cuando se produce el tratamiento inmunodepresor demuestra que el crecimiento celular dirigido por EBV es sensible a la regulación inmunitaria. Es decir, generalmente, en la aparición o no de los procesos tumorales influye un factor principal, que es la capacidad de respuesta del sistema inmunitario.⁸

1.8. Citomegalovirus

1.8.1. Estructura de CMV

Los citomegalovirus son herpes obicuos que constituyen causas frecuentes de enfermedad humana; tienen el máximo contenido genético de herpesvirus humano. Su genoma de DNA tiene una longitud aproximada de 240 kbp.(9)

Forma parte del grupo de los herpesvirus beta y presenta un DNA de doble hebra, es un virus grande y se replica en el núcleo celular. Se trata además de un virus con especificidad de especie que causa enfermedades similares en distintos animales.¹⁷ Figura 3

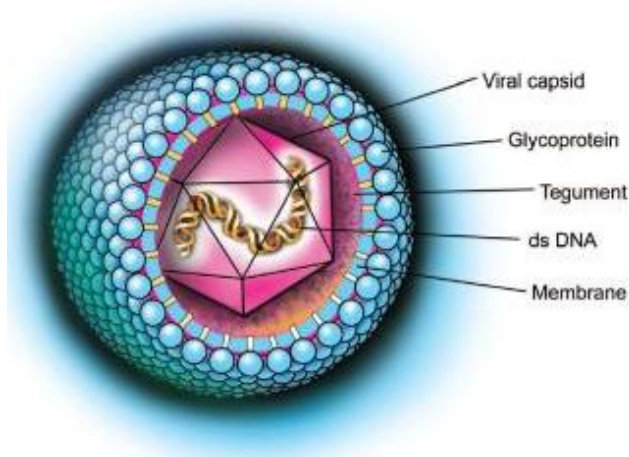


Figura 3: Estructura de Citomegalovirus¹⁸



1.8.2. Fisiopatología de CMV

El citomegalovirus se considera hoy en día uno de los virus causantes de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en trasplantados. Ello refleja como las alteraciones debidas al estado de inmunosupresión de estas personas hacen que su sistema inmune sea incapaz de contener la replicación del virus, básicamente por pérdida de la función de los linfocitos T. En el marco de la respuesta celular, hay evidencias de que las células Natural Killer (NK), los linfocitos B y los linfocitos T CD4+ y CD8+ juegan un papel importante protegiendo el organismo frente al CMV.

La respuesta humoral, por su lado, se dirige principalmente hacia la glicoproteína B de la cubierta y los anticuerpos neutralizantes son probablemente importantes en el control de la propagación del virus a través de la sangre. Las proteínas de tegumento vírico, incluyendo la pp28 (UL99), pp65 y pp150 desencadenan una respuesta de anticuerpos intensa y duradera, pero estos anticuerpos son incapaces de reaccionar con la superficie de viriones y células infectadas y tienen una importancia limitada en la respuesta protectora.¹⁹

1.8.3. Mecanismo oncogénico de CMV

Aunque el citomegalovirus generalmente no se considera un virus oncogénico, la infección por CMV se ha visto implicada en enfermedades malignas de diferentes entidades cancerosas. Sobre la base de hallazgos experimentales, se ha desarrollado el concepto de "oncomodulación" para



explicar mejor el papel del CMV en la neoplasia. Oncomodulación significa que CMV infecta las células tumorales y aumenta su malignidad de una manera que no implica la transformación directa. Postulamos que las células tumorales proporcionan un entorno genético, caracterizado por alteraciones en las vías de señalización intracelular, factores de transcripción y proteínas supresoras tumorales, que permiten al CMV ejercer su potencial oncomodulador, aunque no se puede manifestar en células normales.

Según este concepto, se propuso CMV para ser un objetivo terapéutico en una fracción de pacientes con neoplasias. Sin embargo, la relevancia clínica de la oncomodulación inducida por CMV aún no se ha aclarado.

La oncomodulación inducida por citomegalovirus humano puede ser el resultado de la actividad de las proteínas reguladoras del virus y del ARN no codificante, que influyen en las propiedades de las células tumorales, incluida la proliferación celular, supervivencia, invasión, producción de factores angiogénicos e inmunogenicidad. Como resultado, la infección por CMV puede conducir a un cambio a un fenotipo más maligno de las células tumorales y la progresión tumoral.

En células infectadas con CMV, se inhibe la expresión de las ciclinas D1 y A, aunque están presentes las características de la fase S, que incluyen la sobreproducción de pRB, la activación de ciclina E y ciclina A, y la expresión de muchos genes de fase S.

En las células con mecanismos de control del ciclo celular alterados (como las células tumorales), la función de las proteínas reguladoras del virus puede depender del contexto interno de las células tumorales. En fibroblastos normales que expresan p53 de tipo salvaje, la proteína IE1-72 de CMV no puede expulsar las células de la inactividad, mientras que IE1-72



puede inducir la fase S y retrasar la salida del ciclo celular en células deficientes en p53.¹⁹

1.9. Características clínicas

El carcinoma oral de células escamosas es precedido generalmente por lesiones de la mucosa premalignas (displásicas) clínicamente visibles que aparecen como leucoplasia, que es un término clínico que se refiere a una mancha blanquecina en cavidad oral y corresponde a la presencia de queratina superficial, la cual varía de espesor y su superficie puede ser entre granular nodular a fisurada. También clínicamente podemos encontrar eritroplasias, las cuales se refieren a manchas de tono rojizo en mucosa bucal.

Estas lesiones blancas y rojas con frecuencia, pero no siempre, tienen evidencia histológica de la displasia; siendo la eritroplasia mucho más probable asociada con displasia o carcinoma.

Durante la progresión de la neoplasia, estas lesiones pueden evolucionar hacia la expansión, las úlceras que no cicatrizan. La invasión tumoral es anunciada por el sangrado, movilidad dental, disfagia, disartria, odinofagia o masa palpable en el cuello.

El aspecto clínico de los carcinomas invasivos es muy variable, desde las lesiones ulceradas deprimidas a masas fungosas. Aproximadamente el 30 % de los pacientes con COCE presenta diseminación en ganglios linfáticos regionales/cervicales.²⁰

Sin embargo, el hallazgo más frecuente es el de una tumoración indurada y ulcerada, o de una úlcera dolorosa o no, acompañada a menudo de adenopatías cervicales. El COCE en estadio avanzado puede presentarse bajo tres formas clínicas (figura 4).²⁰



TIPO	CARACTERÍSTICAS
Exofítico	Crecimiento en forma vegetante, hacia afuera. Tumefacción de superficie irregular y dura a la palpación.
Endofítico	Típica úlcera neoplásica, de forma irregular, bordes evertidos y fondo sucio. Dureza a la palpación y sensación de infiltración en los tejidos profundos.
Mixto	Asociado a las dos formas anteriores

Figura 4: Formas clínicas en estadio avanzado de COCE

El tamaño de las lesiones es variable y oscila entre unos milímetros y varios centímetros en los casos avanzados. En general las lesiones asintomáticas suelen ser de tamaño reducido y, a medida que aumentan sus dimensiones, pueden provocar la aparición de síntomas, fundamentalmente dolor, hemorragias, parestesias, halitosis.⁶ Figura 5



Figura 5: Aspecto clínico de COCE en borde lateral de lengua. Imagen A. Fotografía de presencia de una ulcera con zonas mixtas de leucoeritroplaquia. Imagen B. Fotografía de leucoeritroplaquia en borde lateral derecho de lengua.²¹

**Características radiológicas*

La evaluación radiológica se utiliza principalmente para fines de ensayo. TC, resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones, en ocasiones se utilizan para determinar la extensión de la invasión local y la presencia de metástasis a los ganglios linfáticos regionales o distantes.²⁰

1.10. Histopatología

La displasia se refiere a alteraciones neoplásicas del epitelio de la superficie antes de la invasión de la submucosa. Estos cambios incluyen la organización celular anormal, aumento de la actividad mitótica y agrandamiento celular con pleomorfismo. Aunque la terminología varía, encontramos tres tipos principales (figura 6,7).²⁰

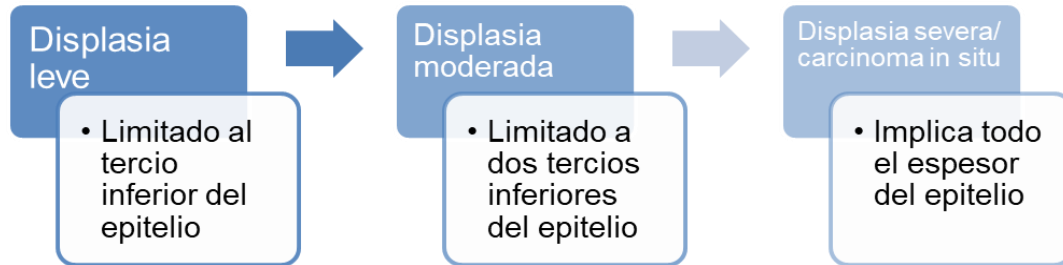


Figura 6: Clasificación de displasias según los tercios de células atípicas presentes.

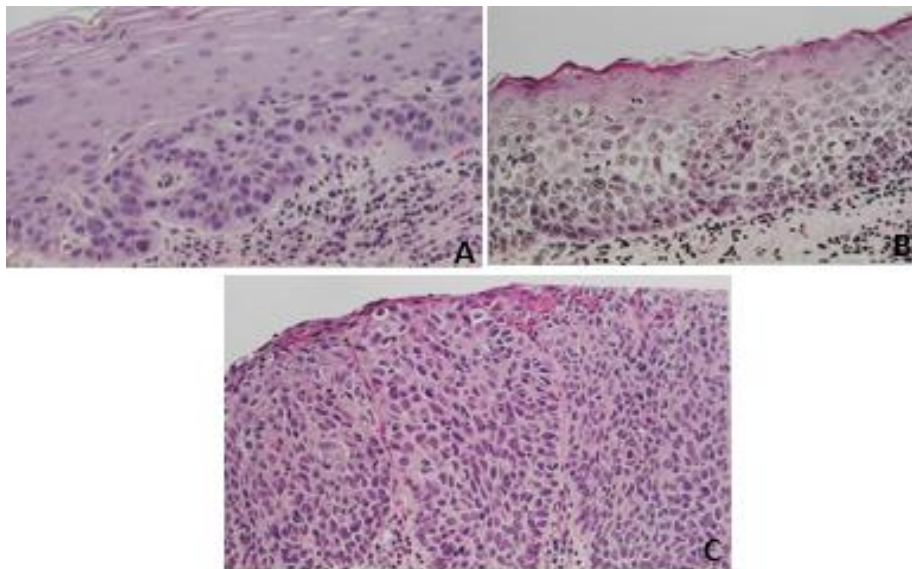


Figura 7: Tipos de displasias en COCE. Imagen A. Displasia leve con cambios atípicos en tercio inferior del epitelio. Imagen B. Displasia moderada con células atípicas presentes en un máximo de dos tercios de epitelio. Imagen C. Displasia severa/carcinoma in situ con células que implican el espesor del epitelio.



Con la progresión, las células invaden a través de la membrana basal. Con el crecimiento del tumor avanzado, nidos tumorales invaden el músculo esquelético y huesos craneofaciales; con frecuencia se desarrolla una invasión del espacio linfovascular y perineural.

El grado del tumor en el COCE varía de bien a mal diferenciado. Carcinomas bien diferenciados muestran diferencia escamosa robusta por la interconexión de nidos de células con citoplasma rosa, puentes intercelulares y formación de perlas de queratina. En el otro extremo, los tumores pobremente diferenciados muestran poca diferenciación escamosa madura. Sin importar el grado del tumor, nidos infiltrantes de COCE tienden a provocar una reacción fibrótica prominente con acogida del estroma (desmoplasia).

Ciertas variantes de COCE se apartan de la apariencia atípica de COCE convencional, a excepción de la variante verrucosa, todos estos pueden ocurrir en la orofaringe como resultado de VPH (figura 8).²⁰



Figura 8: Variantes de COCE



1.11. Pronóstico

La tasa de supervivencia global a 5 años de COCE es ~50%. Sin embargo, la etapa en la que sea diagnosticado el tumor determina en gran medida el resultado: COCE etapa I se asocia con tasa de supervivencia de hasta un 90%, sin embargo, esto se reduce a 30% para el nivel local o regional avanzado de la enfermedad (estadio III o IV). En contraste el COCE; en contraste, el carcinoma de células escamosas en orofaringe tiene dos tipos, aquellos pronósticos definidos relacionados con el VPH de alto riesgo y los que no lo son. El anticuerpo p16 es un marcador sustituto eficaz para la infección por VPH. La supervivencia global a los 5 años para los casos de p-16 positivos es ~80% en comparación con 50% para aquellos de los que son negativos.²⁰

1.12. Tratamiento

Las opciones de tratamiento son muy variables y dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño y localización del tumor primario, extendido a los ganglios linfáticos regionales o sitios distantes, y la capacidad del paciente para tolerar el tratamiento.

Para COCE, la cirugía primaria es el tratamiento estándar. Radioterapia y quimioterapia como adyuvantes, se utilizan a menudo para la enfermedad en etapa más avanzada. El tipo de tratamiento depende en gran medida de la institución; pero la terapia de radiación de intensidad modulada parece dar un mejor pronóstico con tumores asociados a VPH.²⁰



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la aparición de carcinoma oral de células escamosas en pacientes jóvenes ha ido en aumento significativo. En este grupo de pacientes, los factores de riesgo habituales han sido negados, lo que nos hace considerar una posible exposición a diferentes agentes causales de la enfermedad.

Existen pocos estudios acerca de la influencia de determinados virus en el proceso carcinogénico; en específico del COCE. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la presencia de VPH- 16, EBV y CMV. influye de manera importante en el desarrollo de la enfermedad; por lo cual al realizar detección estos virus en muestras de distintos grados de diferenciación histológica, podremos describir si existe relación con su presencia y el desarrollo de la enfermedad.



3. OBJETIVO

Identificar la presencia de VPH- 16, EBV y CMV en tres casos clínicos de carcinoma oral de células escamosas.



4. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento en casos de carcinoma oral de células escamosas en pacientes jóvenes y el reporte de nuevos factores etiopatogénicos, se ha iniciado la búsqueda acerca de la asociación del potencial oncogénico de algunos virus, tales como VPH-16, EBV y CMV en relación al desarrollo de la enfermedad y su posible inclusión en la terapéutica como adyuvante ante el COCE. Por lo cual es importante detectar su presencia a través de los métodos pertinentes.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales y equipo

Inmunohistoquímica

- Xilol y alcohol a diferentes concentraciones (100%, 90%)
- Buffer de citratos 0.01M
- PBS (solución buffer de fosfatos)
- Bloqueador de peroxidasa endógena (BioSB Ref. BSB 005)
- Anticuerpo primario anti VPH 16 (BioSB Ref. BSB-5657)
- TBS (solución buffer Tween)
- Sistema de visualización/Anticuerpo secundario, HRP y DAB (BioSB Ref. 005)
- Horno de microondas (LG Mod. MH1143SR/00)
- Hematoxilina de Mayers
- Resina hidrofóbica para montaje (Entellan Ref. 4111)
- Microscopio (Zeiss- ICS standard 25)

Extracción de DNA genómico

- Relia Prep FFPE gDNA Mini prep System (Promega Cat. A2351)
- Termobloque (Select Bioproducts Mod. SBD110)
- Campana (Edge Gard Mod. EG3252)
- Microcentrifuga (bio RAD Mod. 14K)
- Nanodrop 2000



Ensayo de PCR

- Access RT-PCR system (Promega Cat. A1250)
- Termociclador (Axygen Mod. Maxygene II)
- Agarosa al 4%
- Cámara de electroforesis frontal (Sigma techware Mod. P5254-1)
- Gel de electroforesis con agarosa
- Buffer TAE
- Bromuro de etidio
- Sistema de fotodocumentación (Axygen GDS)

Población

La muestra estuvo conformada por 3 biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma oral de células escamosas, recolectadas en el servicio de diagnóstico histopatológico del Departamento de Patología y Medicina Bucal y Maxilofacial de la D.E.P.e.I, F.O, UNAM. Las características y localización de las muestras tomadas, fueron las siguientes:

EDAD	SEXO	LOCALIZACIÓN	GRADO DE DIFERENCIACIÓN
54 años	Femenino	Dorso de lengua	Poco diferenciado



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS



52 años	Femenino	Borde lateral de lengua	Moderadamente diferenciado
84 años	Femenino	Borde lateral de lengua	Bien diferenciado

Se confirmó el diagnóstico histológico del reporte de un patólogo experimentado (CMRM).

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes a 4 μ m en laminillas silanizadas para su posterior desparafinado y rehidratado de forma convencional en xilol y etanol en concentraciones descendentes. Se realizó la recuperación de antígenos colocando buffer de citratos 0.01M, seguido de un proceso de ebullición durante 4 minutos a potencia 70 en horno de microondas, para posteriormente dejarlo enfriar a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 minutos cada uno, se delimitó con lápiz hidrofóbico alrededor de la muestra para la posterior colocación de bloqueador de peroxidasa endógena durante 10 minutos.

Sumergimos en solución PBS haciendo 3 lavados durante 3 minutos, se agregó el anticuerpo primario anti VPH 16 e incubación durante toda la noche en refrigeración a 4° C.

Se sumergen muestras en solución TBS realizando 3 lavados durante 3 minutos cada uno, se coloca el anticuerpo secundario durante 10 minutos a



temperatura ambiente, para el posterior lavado en solución TBS realizando 3 lavados durante 3 minutos cada uno.

Se colocó peroxidasa de rábano (HRP) durante 10 minutos, 3 lavados en solución TBS durante 3 minutos cada uno. Se aplicó DAB durante 5 minutos; previa dosificación (1ml de buffer DAB – 1 gota de cromógeno); posteriormente se lavó con agua corriente y se realizó un lavado durante 5 minutos con agua desionizada.

Se contratiñeron las muestras con hematoxilina de Mayers durante 5 minutos y se lavó el mismo tiempo con agua corriente. Se deshidrató y aclaró en grados ascendentes de etanol y xilol. Finalmente, se colocó resina hidrofóbica para montaje del cubreobjetos.

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN, se siguió el protocolo según las recomendaciones del fabricante del kit Relia Prep FFPE gDNA Mini prep System.

Se obtuvieron 5 cortes de 10 μm colectados en un tubo Eppendorf estéril de 2 ml; posteriormente se agregaron 300 μl de aceite mineral y se incubó a 80° C por 1 minuto en termobloque; enseguida se colocaron 200 μl de buffer de lisis en el cual se agregaron 5 μl de colorante azul centrifugando a 10,000 revoluciones por 15 segundos a temperatura ambiente.

Se agregaron 20 μl de proteasa K para colocar en el termobloque a 56° C durante 1 hora, reajustando la temperatura a 80°C durante 5 horas.

Se agregaron 10 μl de RNAasa a cada uno de los tubos en la fase clara libre de aceite mineral, incubándolas a temperatura ambiente durante 5 minutos.



Se agregaron 220 μ l de buffer BL y 240 μ l de etanol (95 - 100%), centrifugando a 10,000 revoluciones durante 15 segundos; obteniendo así la separación de la fase acuosa y la fase oleosa en cada uno de los tubos, se centrifugó a 10,000 revoluciones durante 30 segundos para posterior desecho de remanente. Se colocaron 500 μ l de solución de lavado, centrifugado de 10,000 revoluciones durante 30 segundos, desechando el remanente; repitiendo este paso en 2 ocasiones más. Centrifugamos a 14,000 revoluciones durante 11 minutos con las tapas de los tubos abiertas, agregamos 30 - 50 μ l de buffer de elusión y centrifugamos a 14, 000 revoluciones durante 2 minutos. Se refrigera a una temperatura de -30°C - -10°C .

Ensayo de PCR

Para realizar la identificación de EBV y CMV, se siguió el protocolo según las recomendaciones del fabricante del kit Access RT-PCR system. Las secuencias empleadas de los primers para EBV y CMV fueron las siguientes:

Nombre oligo	Secuencia	Escala
LMP1 EBV-us	TGAACACCACCACGATGACT	50nmol
LMP1 EBV-ds	GTGCGCCTAGGTTTTGAGAG	
CMVUL44-us	ATCTAGATTTTCGGCGTGGTG	50nmol
CMVUL44-ds	GTGGAAACTGACGCGGTTAT	



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL
DE CÉLULAS ESCAMOSAS



Se realizaron 40 ciclos de amplificación, resolviendo en un gel de agarosa al 4 % con buffer TAE y bromuro de etidio como colorante. La visualización se realizó en el fotodocumentador Axygen GDS.



6. RESULTADOS

Descripción histológica

Laminillas H y E

Bien diferenciado

En los cortes histológicos examinados se observa una neoplasia de extirpe epitelial, constituida por células escamosas que presentan pleomorfismo celular y nuclear; así como hipercromatismo nuclear. Queratinizaciones individuales que invaden en el tejido conjuntivo fibroso denso en forma de islas, distinguiendo perlas de queratina y áreas de necrosis tipo comedo, presenta infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario severo y difuso, hacia la base observamos tejido muscular, nervioso y tejido adiposo maduro (figura 9).

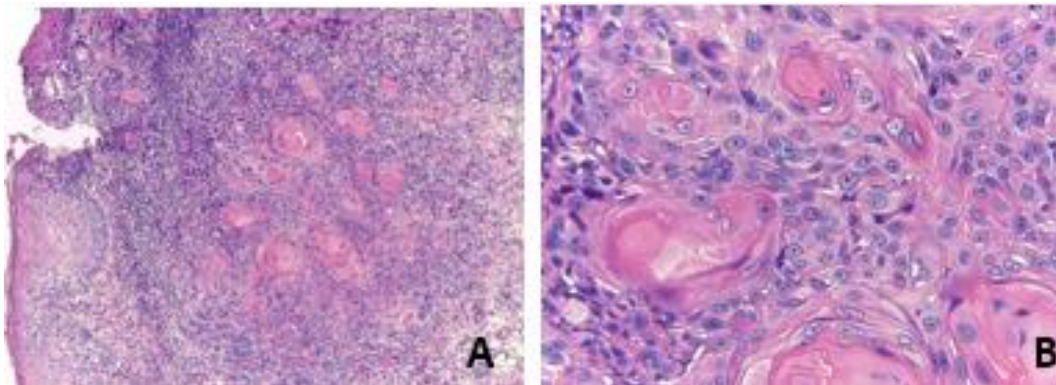


Figura 9: Tinción de H y E de COCE bien diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X.
Fotomicrografía a 100X.^{FD}



Moderadamente diferenciado

En los cortes histológicos examinados se observa una proliferación de células epiteliales, que se hayan infiltrado en el tejido conjuntivo fibroso denso dispuesto en islas. Las células muestran pleomorfismo celular y nuclear, hipercromatismo y abundantes figuras micóticas. Se observan también perlas de queratina y un infiltrado inflamatorio crónico severo y difuso. Hacia la base se observa tejido muscular estriado, escamoso estratificado queratinizado con zonas de edema intracelular (Figura 10).

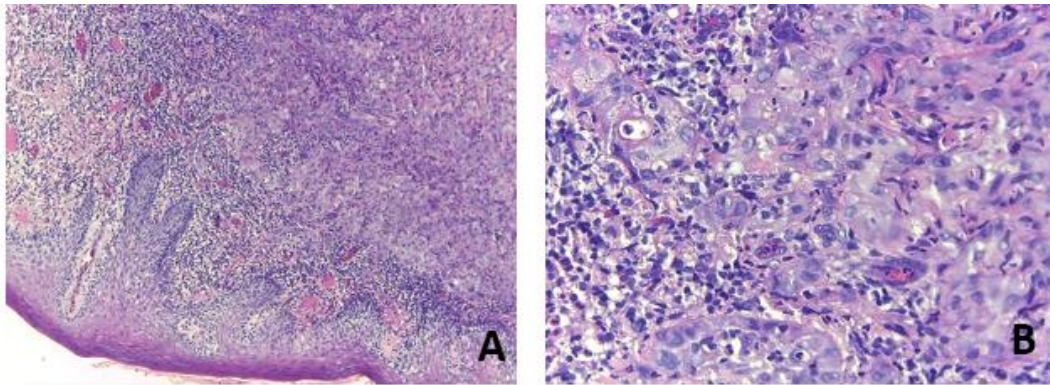


Figura 10: Tinción de H y E de COCE moderadamente diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X. Fotomicrografía a 100X.^{FD}

Poco diferenciado

En los cortes histológico examinados se observan células epiteliales neoplásicas con pleomorfismo celular y nuclear, pérdida de la relación núcleo- citoplasma, mitosis aberrantes y mitosis abundantes. Se identifica epitelio superficial escamoso estratificado, donde se identifica una pérdida de la continuidad. Hacia la base se observa un infiltrado inflamatorio severo linfoplasmocitario, músculo y vasos sanguíneos (Figura 11).

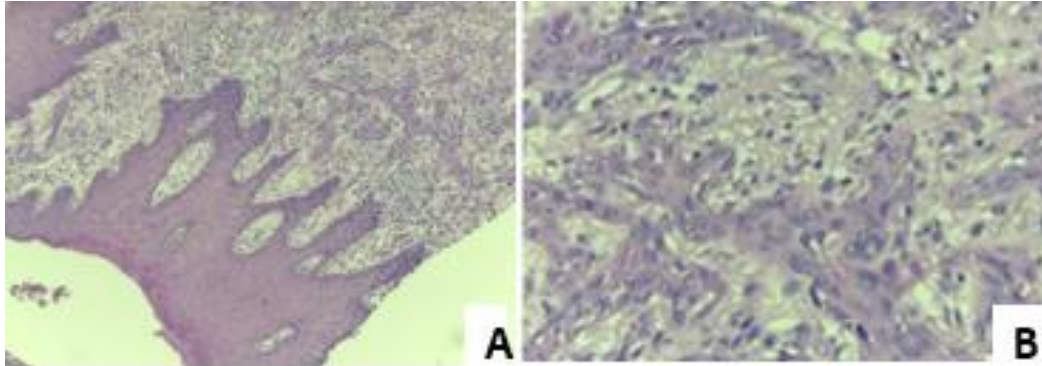


Figura 11: Tinción de H y E de COCE bien diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X.
Fotomicrografía a 100X.^{FD}

En los tres casos clínicos con distintos grados de diferenciación histológica pudimos encontrar presencia de VPH-16 en distintas zonas, representadas en las siguientes imágenes:

Bien diferenciado

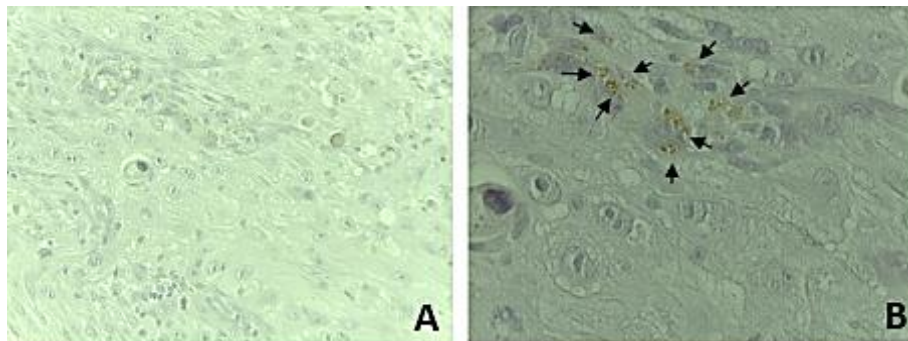


Figura 12: Inmunohistoquímica de COCE bien diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X. Imagen B. Fotomicrografía a 100X, flechas indican células positivas a VPH-16. ^{FD}



Moderadamente diferenciado

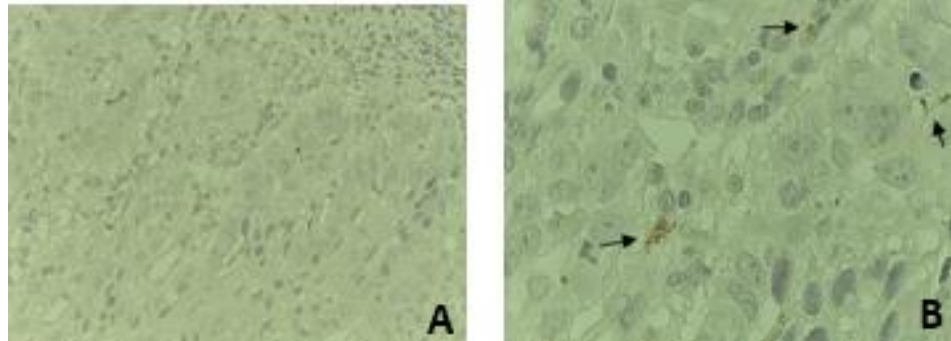


Figura 13: Inmunohistoquímica de COCE moderadamente diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X. Imagen B. Fotomicrografía a 100X, flechas indican células positivas a VPH-16. ^{FD}

Poco diferenciado

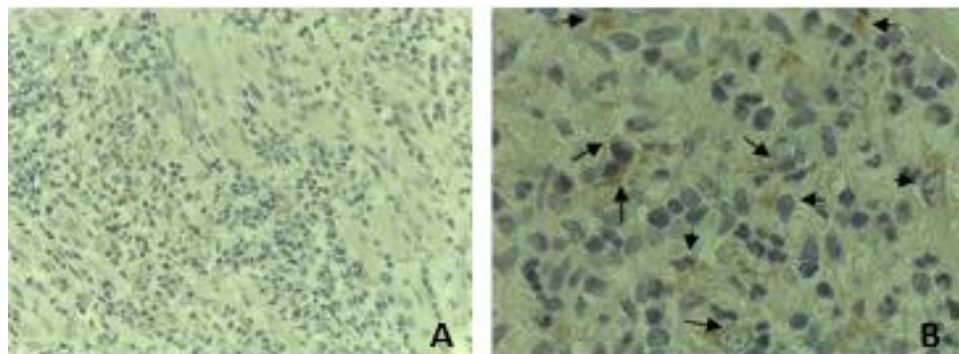


Figura 14: Inmunohistoquímica de COCE poco diferenciado. Imagen A. Fotomicrografía a 40X. Imagen B. Fotomicrografía a 100X, flechas indican células positivas a VPH-16. ^{FD}

La cantidad estimada de células VPH-16+ para el COCE bien diferenciado fue de 8 células, para el moderadamente diferenciado fue de 3 células y para el poco diferenciado fue de 9 células.



Ensayo de PCR

En análisis génico para la detección de los virus CMV y EBV por medio de PCR, no indico presencia de material viral en el ADN génomico (figura 15).

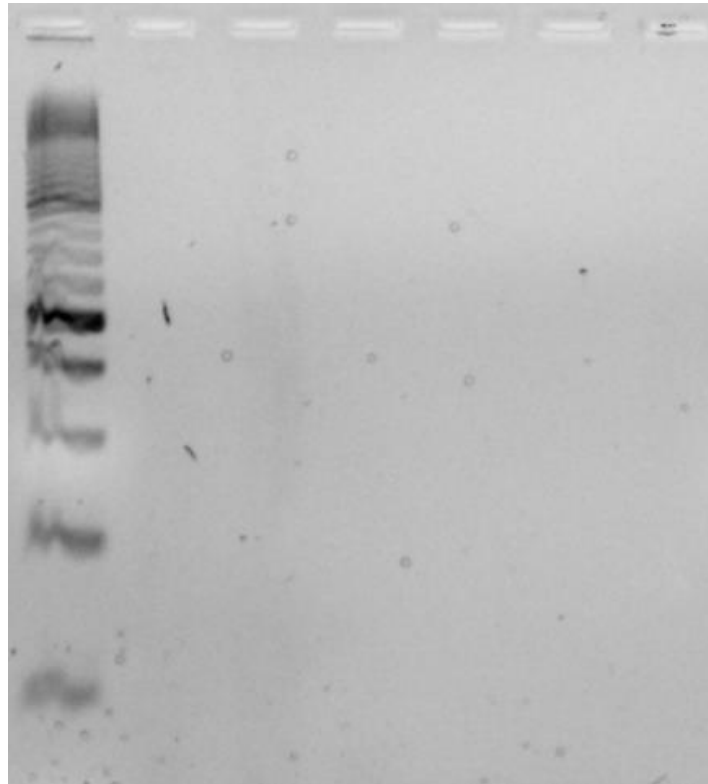


Figura 15: Gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio, donde no se observa ningún caso de positividad génomica viral. ^{FD}



7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se recolectaron tres muestras de carcinoma oral de células escamosas en lengua (un bien, un moderado y un pobremente diferenciado). Todas las muestras fueron de pacientes de género femenino con un promedio de edad mayor a los 50 años (63.3 años); esto concuerda con los reportado por Meza y col.² cuyo trabajo describe la frecuencia de COCE entre la quinta y la séptima década de vida; además de señalar a la lengua como el sitio más común en donde podríamos encontrar esta neoplasia. La edad avanzada y los factores de riesgo tales como el tabaco y alcohol son los más comunes en la población que

presenta el COCE. En relación al género, existen diversos reportes que todavía sugieren mayor frecuencia en el género masculino, sin embargo, debido a los cambios conductuales y de exposición a los factores de riesgo, otros autores reportan frecuencias similares entre los dos géneros, tal como Boza y cols. en el 2016.³

La detección de VPH-16 por inmunohistoquímica es una estrategia valida. En nuestro estudio observamos similar cantidad de células VPH positivas en el COCE bien diferenciado y poco diferenciado. Guillison y Cols.²² consideran que esta es una variable de gran interés debido a la controversia que existe en cuanto a la asociación de VPH en el proceso oncogénico de COCE, ya que en otros tipos de cáncer su papel ya ha sido demostrado ampliamente. Existen reportes que indican que más del 50% de los carcinomas provenientes de orofaringe, particularmente de tonsilas palatinas y base de lengua, contienen VPH oncogénico; lo que nos hace pensar en la relación que existe de la presencia de VPH en especial subtipo 16 como factor etiológico de la enfermedad. En este estudio se seleccionó intencionalmente



DETECCIÓN DE VPH- 16, EBV Y CMV EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS



a los tres casos de la zona anatómica de lengua, para poder contrastar estos datos.

Existen otras estrategias para detectar y tipificar a los diversos virus del papiloma, ya que existen más de 120 subtipos. La estrategia mayormente utilizada es el PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El PCR consiste en extraer material genético (ADN) para su amplificación específica por medio de sondas o primers que son secuencias de nucleótidos que se unen específicamente al gen que se busca detectar y amplificar. Esta estrategia fue empleada para detectar la presencia de CMV y EBV en los tres casos de COCE. Nuestros resultados sugirieron que en ninguna de las muestras obtuvimos positividad viral en el ADN genómico. Veitia y cols. identificaron EBV en un alto porcentaje de sus muestras de COCE estudiadas, relacionándolo con un estadio avanzado y pronóstico reservado, además de sugerir que la presencia de EBV es un posible cofactor de riesgo para el desarrollo del COCE. Respecto al CMV, aún no se ha comprobado totalmente su acción oncogénica, no obstante, se sabe que al infectar a la célula puede generar cambios en el ciclo celular que predispongan mutaciones oncogénicas.



8. CONCLUSIÓN

Al realizar la recolección de resultados podemos concluir que la frecuencia y localización de COCE coincide con lo reportado en la literatura, así como la incidencia en cuanto a género y edad.

El virus de papiloma humano subtipo 16 fue detectado en la totalidad de las muestras, lo que nos hace pensar en que es una variable de interés para el estudio del proceso oncogénico de COCE.

Por su parte, EBV y CMV al no ser encontrado en ninguna de las muestras evaluadas, difiere con algunos reportes en los cuales los refieren como posibles cofactores de riesgo para COCE. Son necesarios nuevos estudios para continuar avanzando en el conocimiento de la relación de los virus con el proceso de la enfermedad. De esta manera, estos estudios podrían ser utilizados en la optimización de protocolos de salud e inclusión de antivirales en el tratamiento de pacientes con esta patología.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De J, Hernández F, Ángeles MDL, Trujillo R. Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas Increased incidence of oral squamous cell carcinoma. Adicciones. 2014;20(i):636–42.
2. García M, Ibarra Jj M, Valencia P, Legorreta C, Barrios A. Oral cavity squamous cells carcinoma, 5 years experience in a third level social assistance center, in Mexico city.
3. Boza Y V, Dds O. Carcinoma oral de células escamosas: Reporte de caso y revisión de literatura Oral Squamous Cell Carcinoma: A Case Report and Review of Literature. ODOVTOS-Int J Dent Sc | No18 Spec Clin Issue [Internet]. 2016;(18):53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.26303>
4. OMS. Globocan 2012 - Home [Internet]. [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
5. Liebana Ureña J. Microbiología oral. Interamericana McGraw- Hill; 2002. 677 p.
6. Bagan Sebastian JV. Medicina bucal. 1a edicion. España; 2008. 444 p.
7. OMS | Factores de riesgo. WHO [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 19]; Available from: http://www.who.int/topics/risk_factors/es/
8. Regezi JA. Oral pathology : clinical-pathologic correlations. 7a edition. 2017. 402 p.
9. IARC Monographs- Classifications [Internet]. [cited 2018 Apr 19].



Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

10. Carroll C K. Microbiologia medica. Mc Graw Hi. 2016. 850 p.
11. Perla CA, María Elisa VM, Graciela ZG, Alma Graciela GC, Ixchel Araceli MG, Juan Carlos CG. Presencia del Virus Papiloma Humano en la Cavidad Oral: Revisión y Actualización de la Literatura. Int J Odontostomatol [Internet]. 2015;9(2):233–8. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2015000200009&lang=pt
12. Vasquez-Bonilla, Verónica R-F, Yeimer O-M. Virus Del Papiloma Humano: Revisión De La Literatura. Cienc e Investig Med Estud Latinoam. 2017;22(1):72–4.
13. Mirghani H, Lacau J. Virus del papiloma humano y cáncer de orofaringe. EMC - Otorrinolaringol. 2016;45(1):1–13.
14. Diagnóstico de VPH - Monografias.com [Internet]. [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://www.monografias.com/trabajos102/diagnostico-vph/diagnostico-vph.shtml>
15. Bellas C, Santon A, Plaza G. VIRUS EPSTEIN-BARR GENERALIDADES [Internet]. [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://www.conganat.org/linfo.tortosa/conf/cap2/gralidad.htm>
16. Virusul Epstein-Barr (EBV) [Internet]. [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://www.ymed.ro/virusul-epstein-barr-ebv/>
17. Denis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dan L. Longo JL. Harrison: Principios de medicina interna. 19a



edicio. Mc Graw Hill; 2016.

18. Sanchez L. Citomegalovirus - TRABAJOS MÉDICOS [Internet]. [cited 2018 Apr 20]. Available from: <http://trabajosmedicos.blogspot.mx/2011/08/citomegalovirus.html>
19. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J, Jr. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. Neoplasia [Internet]. 2009 Jan [cited 2018 Apr 20];11(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107226>
20. Thompson L. Patología de cabeza y cuello. 2a edición. Almoca; 2014. 936 p.
21. Martinez Aguilar JA, Florentino HF, Miranda Herrera O, Jacinto Aleman LF, Hernandez Guerrero JC, Jimenez Farfan MD. Carcinoma oral de células escamosas: reporte de un caso y su relación con la inmunohistoquímica [Internet]. 2013. Available from: <http://www.odonto.unam.mx/index.php?IDPagina=Tema del mes Febrero 2013>
22. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst [Internet]. 2000 May 3 [cited 2018 Apr 20];92(9):709–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793107>