

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Estudio del Virus del Papiloma Humano
como Factor Etiológico y de la
Expresión de P16 en el Carcinoma de
Células Escamosas de la Cavidad Oral**



Elena León Suárez

Universidad de Sevilla, 2014

DON MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Universidad de Sevilla y

DON JOSÉ RAMÓN ARMAS PADRÓN, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Estudio del Virus del Papiloma Humano como Factor Etiológico y de la Expresión de P16 en el Carcinoma de Células Escamosas de la Cavidad Oral”**, desarrollado por **D^a. ELENA LEÓN SUÁREZ** como Trabajo Fin de Máster en Ciencias Odontológicas ha sido realizado bajo su dirección, estando conformes con su presentación al encontrarlo acorde a la normativa actual aprobada por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firman el presente documento en Sevilla a 24 de Junio de 2014.

Fdo. Prof. De Miguel Rodríguez.

Fdo. Prof. Armas Padrón.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Epidemiología	6
1.2. Factores de riesgo	8
1.2.1. Tabaco.....	8
1.2.2. Bebidas alcohólicas	11
1.2.3. Enfermedades de la mucosa oral	12
1.2.4. Enfermedades sistémicas.....	13
1.2.5. Susceptibilidad genética	14
1.2.6. Agentes infecciosos.....	16
1.2.7. Factores dietéticos.....	18
1.2.8. Salud oral y dental	19
1.2.9. Enjuagues bucales con alcohol	20
1.2.10. Exposición ocupacional	20
1.2.11. Estatus socioeconómico	21
1.3. Características clínicas	21
1.3.1. Carcinoma de células escamosas de lengua	21
1.3.2. Carcinoma de células escamosas de suelo de boca	24
1.3.3. Carcinoma de células escamosas de mucosa bucal y encía... 25	
1.3.4. Carcinoma de células escamosas de paladar	27
1.4. Anatomía patológica	28
1.5. Estadios clínicos	31
1.6. Carcinogénesis	33
1.6.1. Cambios genéticos en el carcinoma oral de células escamosas	33
1.6.2. Cambios en genes supresores tumorales y oncogenes en el carcinoma oral de células escamosas	35
1.7. Virus del Papiloma Humano (HPV)	46
1.8. Relación entre HPV y cáncer oral	52
2. OBJETIVO	56
3. MATERIAL Y MÉTODO	58
3.1. Material	58
3.2. Método	60

4. RESULTADOS	63
5. DISCUSIÓN	68
6. CONCLUSIONES	75
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de la cavidad oral pertenece a un grupo de neoplasias englobadas en los denominados *carcinomas de cabeza y cuello* o también llamados *tumores de vías aerodigestivas superiores*. Éstos engloban una gran variedad de neoplasias con diferencias en la incidencia, la forma clínica de presentación, la progresión, el enfoque terapéutico y el pronóstico ¹. Se encuentran localizados en labios, cavidad oral, nariz y senos paranasales, glándulas salivares, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe ²⁻⁴.

Estos carcinomas, entre otros motivos, deben su importancia a su incidencia, ya que se encuentra en el sexto lugar de los cánceres diagnosticados en el mundo, con más de 600.000 casos nuevos diagnosticados anualmente y constituyendo la octava causa más común por muerte debida al cáncer ^{2,5}. Esto se debe a que suelen ser diagnosticados en etapas tardías, teniendo por consiguiente un pobre pronóstico. Además, sus tratamientos podrían dejar severas secuelas funcionales y estéticas, con un gran impacto en la calidad de vida y salud psicológica de los pacientes ⁶.

Más concretamente, el cáncer de cavidad oral define a las neoplasias localizadas en la mucosa de los labios, la mucosa oral, la encía (donde se incluye el triángulo retromolar y el reborde alveolar), el paladar duro, los dos tercios anteriores de la lengua y el suelo de la boca ^{4,6,7}

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de los carcinomas de cabeza y cuello varía en función de las distintas zonas geográficas. Por ejemplo, en Europa se sitúan los sextos en cuanto a incidencia y los octavos en cuanto a tasa de mortalidad ⁸.

Se sabe que la incidencia del cáncer oral es mayor en hombres que en mujeres de edad avanzada ^{1,6}, localizándose con mayor frecuencia en la lengua (particularmente en la porción posterior del borde lateral) ^{9,10}. Además, es más frecuente entre las personas de raza negra que entre las de raza blanca ^{9,10}.

Estas diferencias se relacionan principalmente con factores de riesgo tales como el consumo de alcohol y tabaco, la dieta, el nivel socioeconómico, las creencias culturales y el estado de salud, entre otros ^{6,9}.

Hoy día se están observando variaciones en la incidencia de estos tumores, apreciándose un aumento en mujeres y jóvenes menores de 45 años que no fuman ni beben alcohol ^{6,11}. Estas variaciones están relacionadas con el estudio de nuevos factores causales, como la infección por el virus del papiloma humano (HPV). Según el Programa de Registros de Cáncer de los Estados Unidos durante 1998-2008, existe un aumento en la incidencia de tumores en las zonas relacionadas con el HPV, y viceversa ^{5,6}.

En cuanto a la tasa de mortalidad debida a estos tumores, ésta es más elevada en hombres que en mujeres, y además existen grandes variaciones a nivel mundial, siendo más alta la mortalidad en la zona sur y centro de Asia ⁶.

El carcinoma de células escamosas de la cavidad oral agresivo implica un rápido crecimiento del tumor a estadios avanzados, diseminación de las células tumorales a estructuras vitales y metástasis tempranas regionales o a distancia ¹². Debido a estas características, el cáncer de la cavidad oral tiene un pronóstico relativamente adverso, y su tasa de supervivencia a los 5 años es aproximadamente del 45-50 %; incluso muchos pacientes sufren recidivas o metástasis y mueren al año del diagnóstico ^{6,10-12}. Esto es debido al hecho de que a menudo son diagnosticados en una etapa avanzada ⁶, a pesar de que la cavidad oral es fácil de examinar y accesible para la biopsia, y de que la detección en estadios tempranos se considere la mejor forma de mejorar la supervivencia ¹¹.

Por otro lado, existe una relación entre la localización del tumor y la supervivencia basada en las metástasis a ganglios linfáticos del tumor primario. Así, lesiones en la lengua y en el área del triángulo retromolar tienen un gran riesgo de metástasis al cuello comparada con lesiones en el área de la mucosa bucal o de la encía ^{6,12}. Las lesiones con metástasis en los ganglios linfáticos tienen un pronóstico más pobre, y la supervivencia es significativamente más baja que en caso de no tener metástasis ganglionares. También afecta a la

supervivencia el tamaño del tumor, que está significativamente relacionado con las metástasis subclínicas y las recidivas ¹². Últimamente se ha visto un aumento en la supervivencia en lesiones con presencia del HPV ^{6,7}.

1.2 FACTORES DE RIESGO

Como se ha comentado anteriormente, la aparición de los carcinomas de la cavidad oral está fuertemente asociada con factores de riesgo medioambientales y con el estilo de vida, y se considera de etiología multifactorial. El alcohol y el tabaco se consideran los principales factores etiológicos del cáncer oral. No obstante, las variaciones en la incidencia de los últimos años hace pensar que existen otros factores de riesgo importantes relacionados con estas neoplasias ^{6,7,11-13}.

1.2.1 Tabaco

Tabaco con humo. Se sabe que este es el principal factor de riesgo de cáncer oral ^{6,9-11,14}, aunque se sabe que la zona de la laringe parece ser la más vulnerable a los efectos carcinógenos del tabaco ¹¹.

La actividad carcinogénica se debe a que las distintas partículas que genera el tabaco, como las nitrosaminas y los radicales libres, pueden actuar como iniciador, promotor o como cocarcinógeno ^{4,10,14}. En determinados tipos de tabaco fumado, como es el tabaco en pipa, la displasia se localiza en la zona de colocación de esta, por lo que se tiende a pensar que, en estos casos, el efecto carcinogénico se debe a un efecto térmico e incluso a un trauma físico ⁴.

El riesgo de padecer cáncer oral aumenta con la frecuencia de cigarrillos, la duración del consumo y la edad de inicio del hábito ^{1,4,10,11}. Lo mismo que existe esta demostrada relación causa-efecto, también se sabe que el hecho de dejar de fumar disminuye el riesgo de padecer cáncer oral, y lo hace gradualmente en el tiempo e independientemente de la cantidad de tabaco previamente consumida. El exceso de riesgo desaparece aproximadamente a los 20 años del cese del hábito ¹¹.

Existen estudios sobre cómo afectan los distintos tipos de tabaco fumado a estas neoplasias, viéndose por ejemplo que el tabaco negro tiene mayor riesgo que el tabaco rubio, o cómo el consumo de puros o pipas tiene un mayor riesgo que el cigarrillo industrial ¹¹. En zonas como la India, donde se fuman cigarrillos tradicionales hechos a mano como *bidi*, *chutta* o *cheroot* (son más alcalinos y contienen más sustancias carcinogénicas), existe un mayor riesgo respecto a los cigarrillos industriales. Esto se puede explicar por el hecho de que estos cigarrillos no contienen solo tabaco, sino que en estos países se le podrían añadir otros ingredientes ¹¹.

En general, existen zonas de la cavidad bucal que tienen un mayor riesgo de padecer estas neoplasias. Tanto el suelo de la boca como el paladar blando tienen mayor riesgo que la lengua, la mucosa bucal y las encías ¹¹. Además, en función del tipo de tabaco, se pueden ver más afectadas algunas zonas de la cavidad oral; tal es el caso de puros y pipas, donde se afecta más el paladar blando, el suelo de la boca, la encía y el resto de la mucosa oral que la lengua ¹¹.

Tabaco sin humo. Otra forma de consumo de tabaco es el tabaco sin humo, el cual parece tener también efecto carcinogénico. Aquí tenemos el tabaco masticado y el preparado para ser inhalado (*snuff*).

El tabaco masticado puede ir solo o acompañado de otras sustancias, dependiendo de las distintas zonas geográficas ^{6,11}, y tiene una relación significativa con el riesgo de padecer cáncer oral ^{6,10,11}. Este riesgo aumenta tanto con la cantidad como con la duración del hábito y, en este caso, parece no estar relacionado ni con dejar el hábito ni con la edad de inicio de este ¹¹. Asimismo, es más frecuente la aparición de cáncer en la encía y en el resto de la boca que en la lengua ¹¹. Se ha estudiado el efecto de la combinación de fumar y masticar tabaco, y se ha visto que tiene mayor riesgo que ambos hábitos por separado, aunque sin llegar a ser un aumento multiplicativo ¹¹.

En cuanto al tabaco que se deja en la boca, debajo de los labios o en los vestíbulos bucales, hábito común en Escandinavia y Estados Unidos, no

parece tener un aumento significativo del riesgo del cáncer de la cavidad oral¹¹.

En Suecia es más común el uso de *snuff*, tabaco no fermentado sometido a un tratamiento térmico que lo hace estar libre de microorganismos, disminuyendo así el riesgo de formación de nitratos y nitrosaminas¹¹.

Betel quid. Masticar betel es una práctica tradicional en Asia. Consiste en una mezcla de nuez de areca, hojas de betel y cal apagada (hidróxido de calcio). También puede contener tabaco y otros componentes como edulcorantes, esencias y especias, en función de las preferencias locales de la zona de Asia. Masticar betel con o sin tabaco podría ser un factor de riesgo de cáncer de cavidad oral más fuerte que el tabaco fumado o el consumo de alcohol en esta zona. Además, el betel combinado con tabaco tiene un efecto carcinogénico más fuerte que el que no lleva tabaco. El riesgo de cáncer de la cavidad oral parece aumentar con la duración del hábito y frecuencia del uso, la edad temprana en el inicio del consumo, tragar el fluido generado por la masticación del betel y mantener la mezcla en la boca mientras se está durmiendo; por otro lado, el riesgo disminuye tras la interrupción el consumo. Las zonas de la cavidad oral que parecen ser más sensibles a los efectos carcinógenos del betel son la mucosa oral y la encía, siendo menos sensibles la lengua y el suelo de la boca. El consumo combinado de betel con tabaco y alcohol tiene un efecto más que multiplicativo sobre el riesgo de cáncer de cavidad oral, mientras que la combinación de fumar tabaco y masticar betel produce un aumento en el riesgo pero no tan alto como el anterior. Se sabe que todas las formas para masticación de la nuez de areca son la principal causa de fibrosis de submucosa oral (lesión premaligna de la mucosa oral). Se hacen campañas dirigidas a gente joven y a niños en las escuelas para retrasar en lo posible la edad de comienzo de uso de estos productos^{6,11}.

Marihuana (Cannabis sativa). La marihuana se consume principalmente fumada. Ésta contiene carcinógenos como nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos en niveles que pueden llegar a ser incluso más altos que los que contiene el tabaco fumado. El problema es que, normalmente, los consumidores de marihuana son también fumadores de tabaco y/o

consumidores de alcohol, lo cual puede ser confuso a la hora de hacer un estudio de factores de riesgo de cáncer de cavidad oral. No obstante, hay estudios realizados exclusivamente en no fumadores ni consumidores de alcohol, donde se ve que no existe aumento de riesgo de cáncer relacionado con fumar marihuana, ni con la frecuencia ni con el consumo acumulado con los años ¹⁵.

Exposición ambiental al tabaco. En este caso, los estudios son escasos y no alcanzan una conclusión firme. Lo que sí se observa es que la exposición prolongada (más de 15 años) al humo del tabaco sí está relacionada con un mayor riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello, especialmente de laringe y faringe ^{1,16}.

1.2.2 Bebidas alcohólicas

El riesgo de cáncer de cavidad oral atribuido al consumo exclusivo de alcohol no es tan alto como el del tabaco, aunque igualmente está clasificado como un agente carcinógeno para humanos por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ^{6,9,11}. El alcohol es una droga de abuso más común que ha mostrado relación causal con más de sesenta condiciones médicas diferentes ¹⁴.

El mecanismo carcinogénico del alcohol en la cavidad oral no es del todo bien conocido. Se sabe que, en el metabolismo del alcohol, el etanol, mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, se oxida produciendo acetaldehído, que a su vez es oxidado por la enzima acetaldehído deshidrogenasa hepática produciendo acetato ^{6,10,14}. El efecto carcinógeno del acetaldehído se ha demostrado en animales ⁶. Además, el alcohol podría actuar como solvente, mejorando así la penetración de los carcinógenos en los tejidos orales. También se sabe que el consumo de alcohol disminuye el flujo salival, lo que aumenta la exposición de la mucosa oral a los agentes irritantes ⁶. Además, existen estudios en animales en los que se observa cómo el alcohol altera la permeabilidad de la barrera del epitelio escamoso estratificado de la mucosa oral, lo que hace que otros carcinógenos como los del tabaco puedan llegar con mayor facilidad a capas más profundas del epitelio ⁶.

También se ha sugerido que el riesgo de cáncer aumenta con la cantidad de alcohol diaria ingerida, con la duración del consumo y con el consumo acumulado durante la vida. Algunos estudios demuestran también cómo disminuye este riesgo al dejar de consumir alcohol, de modo que el riesgo va disminuyendo gradualmente mientras se mantenga la abstinencia ¹¹.

El efecto carcinogénico del alcohol varía en función de las distintas zonas de la cavidad oral, siendo más sensibles el suelo de la boca, la zona del triángulo retromolar y la lengua ¹¹.

En cuanto al tipo de bebida alcohólica consumida, existen estudios en los que el tipo de bebida no parece estar relacionado con el riesgo de padecer cáncer, mientras que en otros se observa un riesgo más alto entre los consumidores de ciertos tipos de alcohol ¹¹. De todas formas, cuando la relación entre el tipo de bebida alcohólica y el riesgo de cáncer de cavidad oral es significativa, se podría explicar mediante el hecho de que la respectiva bebida se consuma tradicionalmente más en la población de estudio. Así, por ejemplo, el consumo de cerveza tiene mayor riesgo en Norteamérica, el consumo de licores tiene mayor riesgo en Norteamérica y Latinoamérica, y el consumo de vino tiene mayor riesgo en Europa. Lo que sí se sabe es que la cantidad de bebida consumida y el alcohol contenido en éstas parece ser un factor más importante que el tipo de bebida en sí ¹¹.

Efecto del consumo conjunto de tabaco y alcohol. Se ha visto, de manera específica para el cáncer de cavidad oral, que la combinación de alcohol y tabaco tiene un efecto más que multiplicativo sobre el riesgo de padecer cáncer ^{9,11}. Así, el tabaco aumenta la carga de acetaldehído producido en el metabolismo del alcohol, mientras que el alcohol aumenta la activación de pro-carcinógenos presentes en el tabaco ^{10,14}.

1.2.3 Enfermedades de la mucosa oral

Los cambios moleculares que se producen en la mucosa del tracto aerodigestivo tras exposiciones prolongadas a carcinógenos pueden acabar en lesiones premalignas, cáncer de cabeza y cuello y tumores secundarios ⁴. Además, estas enfermedades orales potencialmente malignas como

leucoplasia y eritroplasia, fibrosis submucosa, liquen plano o candidiasis oral crónica, podrían desarrollar carcinoma de células escamosas en la cavidad oral¹¹. Por lo tanto, las eritroplasias y las leucoplasias se consideran hoy en día lesiones epiteliales premalignas⁶.

Se denomina leucoplasia cuando la lesión es blanquecina, eritroplasia cuando es roja y eritroleucoplasia cuando alterna zonas rojas y blancas. En general, el 15-20% de estas lesiones progresa a carcinoma en los años posteriores a su diagnóstico⁶. Se consideran con mayor riesgo de progresar a carcinoma aquellas lesiones no homogéneas que además tienen una textura superficial granular o verrugosa y que están localizadas en el suelo de la boca o en los bordes laterales de la lengua. Cualquier lesión premaligna localizada en la lengua tiene mayor riesgo de transformación maligna que esa misma lesión situada en cualquier zona de la mucosa oral^{6,11}. Dentro de las alteraciones genéticas y moleculares que conducen a la transformación de las lesiones premalignas a malignas se incluyen pérdidas alélicas de los brazos cromosómicos 3p, 9p y 17p; la amplificación y sobreexpresión de oncogenes myc, cerbB2 y ciclina D1; el aumento de la expresión de citoqueratina 8 (CK8); la hipermetilación, que conlleva a la inactivación de los genes tumorales p16 y p53; la pérdida de heterocigosidad del alelo de p53; la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del factor de crecimiento transformante (TGF), y la desregulación de la apoptosis confirmada por la inmunotinción del Ki67⁶.

La fibrosis de submucosa oral es una lesión no epitelial considerada también premaligna, con afectación de la mucosa bucal, labios, área retromolar y paladar blando. En ésta se produce una transformación fibroelástica de los tejidos conectivos yuxtaepiteliales. Estas lesiones suelen presentar además de la alteración subepitelial una displasia epitelial⁶.

1.2.4 Enfermedades sistémicas

Existen algunas enfermedades sistémicas que pueden afectar la salud oral e incluso llegar a producir desordenes potencialmente malignos o cáncer oral¹¹. Tal es el caso de la diabetes, situación en la que se producen unas condiciones

orales inflamatorias (periodontitis, gingivitis) y/o condiciones atróficas (queilitis, glositis) que pueden favorecer la aparición de lesiones malignas. Tanto la prevalencia de tumores benignos como desordenes potencialmente malignos en diabéticos es mayor que en no diabéticos ^{10,11}.

Estados en los que el paciente tiene disminuidas sus defensas contra los carcinógenos o los mecanismos de defensa y reparación, como son alteraciones genéticas o inmunes, ya sean congénitas o adquiridas (pacientes trasplantados o tratados de cáncer), defectos dietéticos y consumo de drogas, parecen estar relacionados también con un mayor riesgo de cáncer de cavidad oral ^{10,11}. Incluso se ha visto cómo los pacientes sometidos a un trasplante de células hematopoyéticas tienen un mayor riesgo de desarrollar carcinoma oral, principalmente en la lengua, tras un periodo de 5-9 años ¹¹.

1.2.5 Susceptibilidad genética

Determinadas diferencias genotípicas y fenotípicas estarían implicadas en el metabolismo de carcinógenos, mecanismo de reparación del DNA, control del ciclo celular, etc. ^{1,4}. Aunque todavía no se conocen bien los mecanismos, estas diferencias hacen que ciertas personas sean más susceptibles a desarrollar cáncer oral, especialmente en pacientes jóvenes ^{6,17}.

Los polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) son zonas del genoma donde se han alterado las secuencias de ADN. Éstos no parecen tener ningún efecto adverso en individuos normales, pero pueden ser marcadores de predisposición a la enfermedad o pueden ser utilizados para identificar genéticamente los pacientes con esta predisposición ^{10,14}. Los SNPs conducen a efectos fenotípicos por varios mecanismos, entre los que se incluyen el aumento o la reducción de la transcripción, una actividad post-transcripcional alterada o cambios en la estructura de la proteína. Además, los polimorfismos están relacionados con enzimas metabólicas implicadas en la activación y la desintoxicación de carcinógenos químicos (como *xenobiotic metabolizing enzymes*, XMEs), con enzimas relacionadas con la reparación del DNA y genes relacionados con la protección inmune, que podrían modificar la susceptibilidad al carcinoma de células escamosas oral, por ejemplo ^{10,14,17}.

Algunos polimorfismos, como los del gen CCND1 (gen que codifica la ciclina D1) o los de la enzima conjugada UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 (UGT 1A1) y la UGT A7, están relacionados con una mayor susceptibilidad y un mayor riesgo de padecer cánceres de cabeza y cuello ¹⁷.

Un factor genético que predispone en mayor grado son las mutaciones que se producen en pacientes con la anemia de Fanconi, que sufren malformaciones congénitas, fallo de la médula ósea, y presentan predisposición al cáncer, particularmente leucemia mieloide aguda y, sobre todo, carcinoma de células escamosas, especialmente en la cavidad oral ^{14,17}.

Por otro lado, también se sabe que las alteraciones genéticas en los genes GSTP1 y GSTT1 causadas por el tabaquismo pueden influir en el riesgo de malignidad oral ⁶. Además, aunque las diferencias en el riesgo en función de la etnia y el sexo se relacionan más con el estilo de vida (tabaco y alcohol) que con la herencia genética, el riesgo se incrementa en personas que, además de ser fumadas o bebedoras, tienen antecedentes familiares ⁶. En el caso del alcohol, existen algunas diferencias genotípicas relacionadas con un polimorfismo de la enzima alcohol deshidrogenasa. Esto hace que, como hemos visto anteriormente, aumente la concentración de acetaldehído, producto con efecto carcinógeno según estudios en animales. Lo mismo ocurriría en el caso de la mutación de la enzima acetaldehído deshidrogenasa, que impediría el paso de acetaldehído a acetato, aumentando así la concentración del primero ^{6,10}.

La identificación individual de un perfil de riesgo genético para el desarrollo de carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, mediante el empleo de biomarcadores, no solo puede conducir a una mejor comprensión de la enfermedad, sino también a mejorar la orientación y decisiones clínicas, de seguimiento y sobre el tratamiento, pudiendo ser además de gran utilidad en la prevención primaria y en el diagnóstico precoz de la enfermedad ^{1,4,17}.

Además, también se sabe que tener una historia familiar (familiar de primer grado) de cáncer de cabeza y cuello se considera un factor de riesgo multiplicativo a la hora de padecerlo ^{1,4,6,11}. Sin embargo, una historia familiar

de otro tipos de cánceres no parece incrementar el riesgo de cáncer de cavidad oral ¹¹.

1.2.6 Agentes infecciosos

La inflamación causada por infecciones ha sido sugerida como uno de las causas evitables más importantes de cáncer en general. Dado que las infecciones dentales tienen una alta prevalencia en la población, su asociación con el cáncer las hace interesante y un motivo de preocupación ¹³.

Infecciones bacterianas. A menudo, los pacientes con cáncer oral presentan una salud oral pobre en general, suelen tener dientes cariados y periodontitis. El número de dientes perdidos puede estar asociado al cáncer oral, aunque la salud oral puede ir unida a otras variables como son el consumo de tabaco y alcohol que nos confundan y que sean difíciles de controlar a la hora de hacer un estudio epidemiológico. Sin embargo, la enfermedad periodontal ha demostrado aumentar el riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello, incluso en individuos que nunca han consumido alcohol o tabaco. Además, el caso de padecer periodontitis está más relacionado con un carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado que el individuo con salud periodontal ^{13,14}.

Comparando la población microbiana de las zonas sanas y las zonas lesionadas, se han sugerido algunas bacterias orales específicas que desempeñarían un papel relevante en la carcinogénesis. Entre ellas cabe mencionar a *Streptococcus anginosus* y *Treponema denticola* ¹³. El mecanismo carcinogénico de estas bacterias no se conoce exactamente, pero podrían inducir proliferación celular, inhibir la apoptosis, interferir en los mecanismos de señalización celular e incluso actuar como promotores tumorales. También se podría explicar por su capacidad de metabolizar el alcohol, produciendo así un aumento en la concentración de acetaldehído. De todas formas, queda por demostrar si el control de estas bacterias afecta a la incidencia del cáncer oral ¹³.

Candidiasis crónica. *Candida albicans* es el hongo aislado con mayor frecuencia en la cavidad oral, aunque parece que va en aumento el número de

non-albicans Candida albicans (NACA), particularmente entre los pacientes medicamente comprometidos. Las NACA son a menudo resistentes a antifúngicos comunes, y se ha visto un aumento de estos microorganismos en pacientes con cáncer oral. Las cándidas en general tienen más prevalencia en carcinomas que sobre mucosa sana de la boca ^{13,14}.

Estos hongos invaden el epitelio y pueden estar involucrados en los cambios de las leucoplasias y las displasias. Hay estudios animales que confirman su capacidad para provocar transformación maligna en la mucosa oral. Sin embargo, no se conocen los mecanismos carcinogénicos implicados. Podría ser que las nitrosaminas producidas por las cándidas iniciaran el desarrollo de la transformación maligna. También hay que señalar el metabolismo del etanol a acetaldehído, un aspecto en el que tienen particular importancia las NACA ^{13,14}. Por otro lado, podría haber un efecto sinérgico entre la candidiasis y el estilo de vida en la carcinogénesis oral, ya que se puede asociar a otros factores de riesgo como son el tabaco y el alcohol ¹³. Sin embargo, no hay estudios que demuestren que el control de las candidiasis mejore la incidencia de cáncer oral ¹³.

Infecciones virales. Los mecanismos virales de carcinogénesis están principalmente relacionados con la manipulación de la regulación genética de las células ¹³.

Virus del Papiloma Humano. Como se menciona en el apartado 1.1, hoy día se están observando variaciones en la incidencia del cáncer de la cavidad oral, aumentando los casos de mujeres y jóvenes menores de 45 años de edad que nunca han bebido alcohol o fumado ^{6,11,14,18}. Estas variaciones están relacionadas con el estudio de nuevos factores causales, como son la infección por el virus del papiloma humano (HPV) ^{6,14,18}. Este aspecto se menciona más detalladamente en el apartado 1.7.

Herpesvirus. El virus Epstein-Barr (EBV) está fuertemente relacionado con varias patologías malignas humanas, incluido el carcinoma de células escamosas oral. También se han encontrado niveles altos de anticuerpos frente al virus del herpes simple (HSV-1 y HSV-2) en pacientes con cáncer oral

cuando se comparan con los controles. Además, utilizando técnicas de hibridación *in situ*, se ha detectado con mayor frecuencia en tumores orales, situados en los laterales de la lengua. Si añadimos a seropositividad a HSV el hábito de fumar, se aumenta el riesgo de padecer cáncer ^{6,13,14}. Además del virus Epstein-Barr, los virus herpes más comúnmente implicados en el cáncer oral son el herpesvirus humano tipo 8 (HHV-8) y el citomegalovirus ³.

Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La relación entre VIH y cáncer oral no está clara. Hay casos de individuos con VIH positivo o SIDA con mayor índice de cáncer oral, pero esto puede estar enmascarado por el consumo de tabaco y alcohol, o también por la mayor prevalencia de infección oral por el HPV que sufren estos pacientes ^{6,13}.

Aunque todos estos virus pertenecen a distintas familias y usan distintas estrategias para contribuir al desarrollo del cáncer, comparten algunas características, como la habilidad de infectar pero no matar su célula huésped. Estos virus oncogénicos tienden a estabilizar una infección de manera persistente, desarrollando estrategias para evadir la respuesta inmune del huésped. Además, existen otros cofactores como son la inmunidad del huésped y la inflamación crónica, así como mutaciones celulares adicionales del huésped, que también juegan un papel importante en el proceso de transformación celular ³. Por otro lado, en general no existen estudios que demuestren que el control de las infecciones virales afectaría a la incidencia de cáncer oral ¹³.

1.2.7 Factores dietéticos

Una dieta desequilibrada y/o con deficiencias es la responsable de un cierto número de cánceres de faringe y cavidad oral ^{10,11}. Por el contrario, una dieta rica en productos frescos, frutas, verduras crudas o cocinadas, pescado, carotenoides y aceite de oliva, está relacionada con una disminución del riesgo de cáncer en la cavidad oral, aunque también en la orofaringe, hipofaringe, y laringe ^{1,4,6,11,13,14}. Una dieta rica en estos alimentos, como la llamada dieta mediterránea, ha demostrado su asociación con la disminución en el riesgo de cáncer oral ^{14,19}. Esta disminución está relacionada con la cantidad consumida

de estos alimentos, y parece tener mayor relación con las verduras que con las frutas ¹¹. La fibra consumida, probablemente la contenida en frutas y verduras, también disminuye el riesgo de cáncer oral ¹¹.

En cuanto a las vitaminas, la vitamina C (antioxidante) es un factor protector ante el cáncer oral, aunque en realidad es difícil separar el efecto aislado de la vitamina C de los efectos del consumo de frutas y verduras. Igualmente se han encontrado efectos protectores con el consumo de vitaminas E, A y D ^{1,4,9,10}. Asimismo, un déficit en hierro y glutatión produce un aumento de estrés oxidativo, el cual, parece aumentar el riesgo de padecer cáncer oral ^{10,13}.

Existe mayor riesgo de padecer cáncer oral en dietas ricas en carnes rojas, grasa animal, mantequillas, pescados ahumados (que tienen un elevado contenido en nitrosaminas) y en salazón, y alimentos fritos ^{1,4,9,11,13}.

Hay estudios menores relativos a otros grupos de alimentos, en los que se observa cómo por ejemplo el alto consumo de pan está inversamente asociado al cáncer de cavidad oral y lengua; sin embargo, también se ha descrito que algunos tipos de cereales, como el trigo o el mijo, pueden aumentar el riesgo de cáncer de cavidad oral ¹¹.

El consumo de mate, una bebida muy utilizada en América del Sur, parece estar relacionado con el aumento de riesgo de cáncer de lengua y de cavidad oral en general. En este caso, es importante realizar estudios para ver cómo afecta la alta temperatura de la bebida en el proceso de carcinogénesis ^{6,11,20}.

1.2.8 Salud oral y dental

Existen distintos indicadores para valorar la salud dental y oral, como son la frecuencia diaria de cepillado dental, el material usado, el número de pérdidas dentarias, dientes empastados o dañados, ser portador de prótesis removible, frecuencia de revisiones médicas, sangrado de encías y movilidad dental. Una salud dental y oral pobre puede estar asociada a un bajo nivel tanto socioeconómico como educacional, así como al consumo de tabaco y/o alcohol. Sin embargo, la mala salud oral y dental es un factor de riesgo independiente para el cáncer de la cavidad oral ¹¹.

En el caso de dientes deteriorados, empastados o rotos se ve que no existe relación con el riesgo de cáncer oral. Igualmente ocurre con las personas portadoras de prótesis removibles, aunque en estos casos, cuando las prótesis están mal ajustadas y causan daños (úlceras), sí se ve aumentado el riesgo de padecer la enfermedad ¹¹.

También se ve una disminución del riesgo en aquellas personas que están siendo tratadas de alguna patología (ortodoncia, periodoncia) y acuden periódicamente a revisiones dentales, comparado con aquellas que no acuden regularmente a revisiones ¹¹.

La enfermedad periodontal (definida clínicamente con sangrado de encías y movilidad dental, y radiológicamente por la pérdida de hueso alveolar) tiene una fuerte relación con el cáncer oral. Dicha relación aumenta en los casos en los que se observa una mayor pérdida ósea alveolar, y es aún mayor en el caso de pacientes fumadores ^{10,11}.

1.2.9 Enjuagues bucales con alcohol

Se han diseñado estudios para determinar cómo afecta al cáncer oral el uso de enjuagues bucales que contienen alcohol, llegándose a conclusiones contradictorias. Son estudios con resultados difíciles de interpretar e incluso en los que no se han tenido en cuenta factores importantes como el consumo de alcohol y/o tabaco, o la concentración de alcohol que contiene el enjuague bucal en cuestión. Por lo tanto, la evidencia de que el uso de enjuagues bucales con alcohol aumenta el riesgo de cáncer oral es bastante limitada ^{10,11}.

1.2.10 Exposición ocupacional

Aunque se han observado factores de riesgo en varias ocupaciones e industrias, como por ejemplo el asbesto o el percloroetileno (solvente orgánico usado en la limpieza en seco), los resultados no son del todo concluyentes. Además, tampoco se han tenido en cuenta en este caso factores como el consumo de tabaco y/o alcohol ^{1,4,11}. También podría considerarse como mayor riesgo de cáncer la exposición a radiaciones ionizantes terapéuticas o naturales, pero hay pocos datos en cuanto a aumento de riesgo del cáncer oral ¹⁴.

1.2.11 Estatus socioeconómico

Hay tres parámetros para definir el estatus socioeconómico: ingresos, categoría socio-profesional y nivel de educación. Se observa un aumento de riesgo de cáncer oral tanto en las categorías socio-profesionales más perjudicadas, como en las personas con un nivel económico y educacional más bajo. Además, el estatus socioeconómico y la inestabilidad social (divorcio, desempleo, soltería) suele estar ligado a estilos de vida asociados a factores de riesgo de cáncer oral, como el consumo de tabaco y el alcohol. Por ejemplo, en la India, el consumo de tabaco masticado es más frecuente entre los ancianos y las personas con un estatus socioeconómico bajo ^{4,6,11,14}.

1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El tipo histológico más común (95%) de los cánceres malignos de cabeza y cuello es el carcinoma de células escamosas, y lo más frecuente es que aparezcan en la cavidad oral ^{2,3,7}. Estos carcinomas suelen iniciarse en la mucosa, rara vez lo hacen en la submucosa ^{4,21}.

1.3.1 Carcinoma de células escamosas de lengua

El carcinoma de células escamosas de la lengua es el proceso maligno intrabucal más común, suponiendo el 25-40% de los carcinomas de la boca. Son más frecuentes en hombres de 60 a 80 años aunque ocasionalmente también se pueden dar en personas muy jóvenes, presentando en estos casos una conducta bastante agresiva. Casi siempre es asintomático, aunque en las últimas etapas, cuando ocurre la invasión profunda, el dolor o la disfagia pueden ser quejas prominentes del paciente. Se puede presentar clínicamente de cuatro formas: una úlcera indurada con bordes elevados que no cicatriza, una lesión roja, una lesión blanca o una lesión blanca y roja. Algunas veces puede presentar un patrón de crecimiento exofítico notorio y también uno endofítico. Un pequeño porcentaje de casos de leucoplasia lingual está representado por el carcinoma invasivo de células escamosas, que se

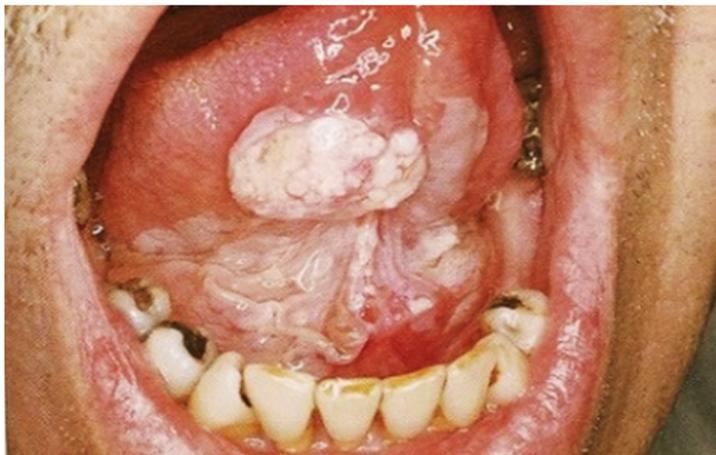
convierte con el tiempo en carcinoma de células escamosas. Prácticamente todas las placas eritroplásicas que aparecen sobre la lengua, son carcinomas de células escamosas *in situ* o invasivos en el momento que se descubren ²¹.

La localización más común de la neoplasia en la lengua es la porción posterior del borde lateral; raras veces se desarrolla sobre el dorso o la punta. Aproximadamente el 25% de los cánceres de lengua surgen en el tercio posterior o base de este órgano. Dichas anomalías son más problemáticas que otras, debido a su avance asintomático en un área difícil de visualizar. De acuerdo con lo anterior, estas lesiones suelen estar más avanzadas o revelan metástasis regionales en el momento de su descubrimiento, lo que refleja un pronóstico bastante peor en comparación con la afectación de los dos tercios anteriores. En los casos de carcinomas de base de lengua positivos a la infección por el HPV, los individuos no fumadores y no consumidores de excesivas cantidades de alcohol tienen un pronóstico mejor que los carcinomas en la misma localización relacionados con el consumo de tabaco y alcohol ²¹.

Las metástasis del cáncer lingual son relativamente frecuentes en el momento del tratamiento primario. Los depósitos metastásicos del carcinoma lingual de células escamosas se observan en los ganglios linfáticos del cuello, casi siempre sobre el mismo lado del tumor. Los primeros ganglios dañados son los submandibulares o yugulodigástricos en el ángulo de la mandíbula (niveles anatómicos I y II). Raras veces se pueden detectar depósitos metastásicos distantes en pulmón o hígado ²¹.



Fig. A: Lesión en el borde lateral de la lengua ²¹.



B

Fig. B: Lesión en la cara ventral de la lengua ²¹.



C

Fig. C: Lesión en el borde lateral de la lengua ²².



D

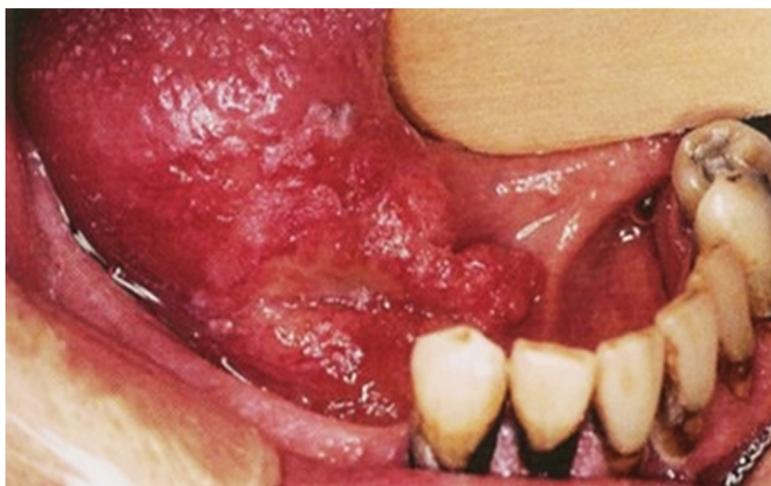
Fig. D: Lesión en el borde lateral de la lengua, tercio posterior ²¹.

1.3.2 Carcinoma de células escamosas de suelo de boca

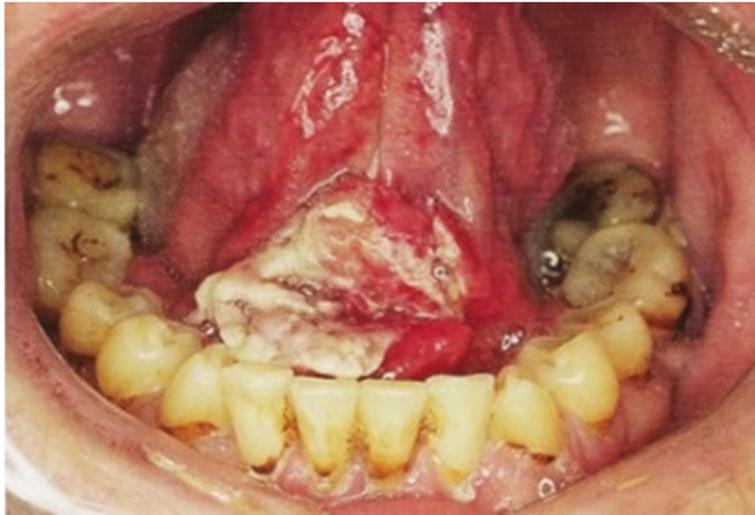
El suelo de boca es la localización intrabucal que ocupa el segundo lugar como sitio más frecuente de carcinoma de células escamosas (15-20% de los casos). Los carcinomas en esta zona se presentan más en hombres de edad avanzada, en particular en fumadores y alcohólicos crónicos. El cuadro habitual de presentación es el de úlcera indurada e indolora que no cicatriza. También puede adoptar la forma de placa blanca o roja. En ocasiones, la lesión puede infiltrar extensamente los tejidos blandos del suelo de la boca, produciendo así una reducción de la movilidad de ésta. La metástasis a ganglios linfáticos submandibulares no es infrecuente en las lesiones del suelo de la boca ²¹.



A



B



C



D

Fig. A, B, C, D: Lesiones en el suelo de la boca ²¹.

1.3.3 Carcinoma de células escamosas de mucosa bucal y encía

Las lesiones de la mucosa bucal y de la encía explican, cada una, casi un 10% de los carcinomas bucales de células escamosas. El grupo más frecuentemente afectado son los hombres de 70 años de edad. En estas lesiones malignas, el factor etiológico más importante es el hábito de masticar tabaco. El cuadro clínico inicial varía desde una placa blanca hasta una úlcera que no cicatriza y una lesión exofítica. En este último grupo mencionado está la entidad clínico-patológica denominada *carcinoma verrucoso*. Esta variante del carcinoma de células escamosas se presenta como una masa de base ancha,

en forma de verruga. Es de crecimiento lento y muy bien diferenciado, raras veces metastatiza y su pronóstico suele ser favorable ²¹.



A



B



C

Fig. A, B, C: Lesión en la encía ^{21,22}.



Fig. D: Lesión en la mucosa bucal y en la encía ²².

1.3.4 Carcinoma de células escamosas de paladar

Existe cierta justificación para distinguir el cáncer de los paladares duro y blando. En el paladar blando y tejidos contiguos de la fauces, el carcinoma de células escamosas ocurre con bastante frecuencia y explica del 10 al 20% de las lesiones intrabucales. Por el contrario, en el paladar duro, los carcinomas de células escamosas son relativamente infrecuentes, aunque el adenocarcinoma es bastante común. Sin embargo, no son raros los carcinomas del paladar en países como India, donde se acostumbra a fumar *al revés* ²¹.

Los carcinomas de células escamosas del paladar se presentan en general como placas asintomáticas de color rojo o blanco, o bien como masas queratósicas ulceradas (el adenocarcinoma aparece al principio como masa no ulcerada) en hombres de edad avanzada. Las metástasis a ganglios cervicales o lesiones grandes implican un curso ominoso de la enfermedad ²¹.



A



B

Fig. A y B: Lesiones en el paladar ^{21,22}.

1.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA

Casi todos los carcinomas bucales de células escamosas son lesiones moderadas o bien diferenciadas. Son evidentes con frecuencia perlas de queratina y queratinización de células individuales. También es típica la invasión de estructuras adyacentes en la forma de pequeños nidos de células hiper cromáticas. La extensión del carcinoma *in situ* al interior de los conductos excretores salivares puede considerarse un signo microscópico de alto riesgo para posibles recurrencias. Se observan variaciones considerables en el número de mitosis, pleomorfismo nuclear y cantidad de queratinización entre distintos tumores. En cortes de lesiones poco diferenciadas, teñidas con

hematoxilina-eosina, no se observa queratina o se encuentra en cantidades mínimas. Sin embargo, ésta puede identificarse usando técnicas inmunohistoquímicas para demostrar determinantes antigénicos sobre filamentos intermedios de queratina, por otra parte ocultos. Casi siempre se observa una reacción inflamatoria significativa del huésped alrededor de los nidos de las células del tumor invasivo, encontrándose gran número de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos ²¹.

Es raro que aparezca un carcinoma bucal de células escamosas como proliferación de células fusiformes, y, en tal caso, puede confundirse con un sarcoma. Este tipo de tumor, conocido como **carcinoma de células fusiformes**, se origina a menudo en la superficie epitelial de los labios, y en ocasiones en la lengua. Se pueden utilizar tinciones de inmunohistoquímica para detectar antígenos a queratina en esta lesión, cuando los cortes teñidos con hematoxilina-eosina revelan datos dudosos ²¹.

Otro posible variante es el **carcinoma verrucoso**, que se distingue por tener células epiteliales muy bien diferenciadas, de aspecto más hiperplásico que neoplásico. Una característica clave es la naturaleza invasiva de la lesión, manifestada por márgenes amplios que avanzan. El frente de la lesión está rodeado habitualmente de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. El diagnóstico basado solo en características microscópicas es difícil, siendo por lo general necesario considerar la lesión en el contexto del cuadro clínico. El **carcinoma papilar de células escamosas** se asemeja al carcinoma verrucoso, pero es menos diferenciado y tiene un peor pronóstico ²¹.

Otra variante microscópica es el **carcinoma basaloide-escamoso**. Es biológicamente muy maligno, y presenta predilección por la base de la lengua y la faringe. En estos tumores se observa un patrón basaloide de células tumorales adyacentes a células tumorales que evidencian diferenciación escamosa. En el examen microscópico, este tumor puede confundirse con el **carcinoma basaloide adenoidequístico** y con el **carcinoma adenoescamoso**. La separación de esta forma de carcinoma en HPV 16 positivo y negativo, mediante la técnica de hibridación *in situ*, nos lleva a reconocer un patrón de comportamiento menos agresivo en los casos de

carcinomas HPV 16 positivos comparándolos con los negativos y, por tanto, un mejor resultado clínico ²¹.

El diagnóstico del carcinoma de células escamosas se confirma con la toma de una biopsia. Ésta se realiza tomando generalmente un fragmento de la lesión, en los casos iniciales de aquella zona que observemos clínicamente más alterada, y, en los casos avanzados, bien de los bordes de la úlcera o de aquellas zonas donde se palpe induración o infiltración, puesto que si es muy superficial puede resultar un falso negativo. Se han propuesto diversas clasificaciones desde el punto de vista patológico, siendo la más aceptada la de la O.M.S. que los divide en tres grados de malignidad ²²:

- **Bien diferenciados:** presentan una gran semejanza con las células epiteliales, se observa abundante formación de queratina en forma de perlas córneas o como queratinización celular individual. La atipia celular es mínima, así como el número de mitosis. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico peritumoral bastante marcado, formado por linfocitos y células plasmáticas ²².
- **Moderadamente diferenciados:** presentan menor semejanza con las células epiteliales, y el grado de atipia nuclear así como el número de mitosis es mayor. Por otra parte, disminuye la formación de perlas córneas y la queratinización individual ²².
- **Pobrementemente o poco diferenciados:** la similitud con las células epiteliales es tan pequeña que en ocasiones es difícil establecer el origen escamoso de estos tumores, y hay que recurrir a técnicas inmunohistoquímicas para demostrar si hay positividad a la citoqueratina. Existe un gran pleomorfismo nuclear y un elevado número de mitosis ²².

Los tumores se clasifican según el área más indiferenciada. Se ha observado que existe correlación entre la gradación histológica y el pronóstico del paciente ²².

1.5 ESTADIOS CLÍNICOS

Para el seguimiento clínico y terapéutico de los pacientes, se utiliza, la *clasificación TNM* dada por el *American Joint Committee on Cancer* en colaboración con la *Unión Internacional Contra el Cáncer* ²². La clasificación TNM para describir la extensión anatómica de la enfermedad se basa en tres parámetros:

1. Tamaño tumoral (T)
2. Presencia de ganglios (nodos) linfáticos regionales a la palpación (N)
3. Presencia o no de metástasis a distancia (M)

Dentro de cada parámetro, tenemos las siguientes subdivisiones:

- T_x: no puede evaluarse el tumor primario.
- T₀: no hay evidencia de tumor primario.
- T_{is}: carcinoma *in situ*.
- T₁: tumor menor de 2 cm de diámetro.
- T₂: tumor de 2-4 cm de diámetro.
- T₃: tumor mayor de 4 cm de diámetro.
- T_{4a}: tumor que afecta al hueso cortical, seno maxilar o piel de la cara.
- T_{4b}: tumor que afecta al espacio masticador, apófisis pterigoides o base del cráneo.
- N_x: no pueden evaluarse los ganglios regionales.
- N₀: no hay metástasis a ganglios linfáticos regionales.
- N₁: metástasis en un solo ganglio linfático homolateral menor de 3 cm.
- N_{2a}: metástasis en un solo ganglio linfático homolateral de 3-6 cm.
- N_{2b}: metástasis en múltiples ganglios homolaterales, ninguno mayor de 6 cm.
- N_{2c}: metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mayor de 6 cm.
- N₃: metástasis en ganglio linfático mayor de 6 cm.

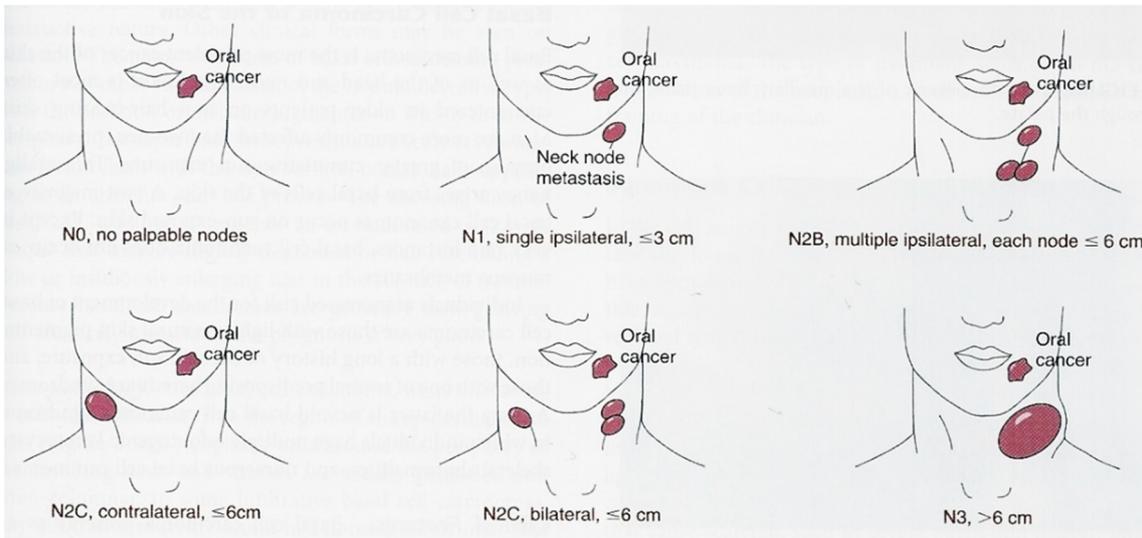


Fig.1. Distintos grados de afectación de los nódulos linfáticos en el cáncer oral ²¹.

- M_x: no se pueden evaluar las metástasis a distancia.
- M₀: no hay metástasis a distancia.
- M₁: hay metástasis a distancia.

Según estos parámetros, obtenemos cuatro estadios clínicos, que son:

- **I:** T₁ N₀ M₀
- **II:** T₂ N₀ M₀
- **III:** T₃ N₀ M₀; T₁₋₃ N₁ M₀
- **IVA:** T_{4a} N₀₋₁ M₀; cualquier T_{1-4a} N₂ M₀
- **IVB:** T_{4b}, cualquier N M₀; cualquier T, N₃, M₀
- **IVC:** cualquier T, cualquier N, M₁

Los estadios I y II, se consideran iniciales, ya que en ellos no hay metástasis ganglionares y el tamaño es menor de 4 cm en general. Se ha observado que ambos estadios tienen un buen pronóstico, con una tasa de supervivencia elevada. Sin embargo, los estadios III y IV se consideran avanzados, disminuyendo en gran medida el porcentaje de supervivencia global.

Los ganglios linfáticos más afectados son los submaxilares y los de la cadena cervical superficial y profunda. Las metástasis a distancia, por vía sanguínea, se localizan con más frecuencia en pulmón, hígado y huesos.

1.6 CARCINOGENESIS

La carcinogénesis oral, al igual que ocurre en otros cánceres, es un proceso de múltiples pasos a través del cual las células normales son transformadas a células premalignas o potencialmente malignas, caracterizadas por tener la habilidad de replicarse de forma autónoma. Todo este proceso requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones incluyen expresiones aberrantes y alteraciones funcionales que afectan a la regularización de la señalización celular, el crecimiento, la supervivencia, la motilidad, la angiogénesis y el control del ciclo celular. El concepto fundamental del mecanismo genético del cáncer es la sobreexpresión o sobreactividad de oncogenes y/o el silenciamiento de genes supresores tumorales. Todas estas alteraciones son la verdadera razón de la adquisición progresiva del fenotipo maligno del queratinocito, convirtiéndolo en una célula maligna caracterizada por una proliferación incontrolada y que podría resultar en un cáncer, caracterizado por la invasión de la membrana basal epitelial y con metástasis eventuales ^{10,14,17,23,24}.

El metabolismo enzimático carcinogénico, no obstante, varía de persona a persona, según las bases genéticas de cada individuo. También hay una amplia serie de enzimas reparadoras de DNA, las cuales pueden reparar las mutaciones, y en éstas también encontramos diferencias genéticas entre los individuos ¹⁰.

1.6.1 Cambios genéticos en el carcinoma oral de células escamosas

Aberraciones cromosómicas, como son eliminaciones, amplificaciones y reordenamientos estructurales, son señales de identidad de la malignidad y se observan en tumores de cabeza y cuello (Tabla 1) ¹⁷.

Chromosome	Chromosome region – alteration
1	Loss 1p36.3
2	Loss 2q35, 2q36
3	Loss 3p13–14, 3p21, 3p25; gain 3q25-ter
4	Loss 4q25, 4q31–32
5	Loss 5q21–22; gain 5p
6	Loss 6q13, 6q25
7	Loss 7q31; gain 7p11
8	Loss 8p21, 8p22, 8p23; gain 8q22, 8q23-ter
9	Loss 9p21
10	Loss 10q23, 10q26
11	Loss 11q22.2–22.3; gain 11q13
12	Gain 12p12.2–13
13	Loss 13q14.3
14	Gain 14q31–32.2
15	Gain 15q15
16	Gain 16q23–24
17	Loss 17p13; gain 17q24–24
18	Loss 18q; gain 18p
19	Gain 19q
20	Loss 20p11.2; gain 20q
21	Loss 21q11.1, 21q21, 21q22.2
22	Loss 22q13

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas comunes en carcinomas de cabeza y cuello ¹⁷.

Entre estas aberraciones, cabe destacar la pérdida del cromosoma **3p**, que se observa con alta frecuencia y en la que se sugiere que podrían albergarse oncogenes y genes supresores tumorales importantes para la iniciación o progresión del cáncer oral. Otra alteración importante es la pérdida heterocigótica **9p21**, evento común en displasias (30%) y en carcinoma oral de células escamosas (70-80%), y que además tiene un importante valor en el diagnóstico temprano y vigilancia del tumor ^{12,17}. Además, esta pérdida es relevante porque en esta zona se codifican genes supresores tumorales importantes, como son el p16, p15 y p14, entre otros ^{12,24}.

Según datos recientes, se sabe que aproximadamente el 30% de los casos de cáncer oral están rodeados por grandes zonas de células con cambios genéticos relacionados con el cáncer. Estas zonas, frecuentemente, permanecen cuando el tumor es extirpado, causando así tumores secundarios que son clínicamente asignados como recurrencias o como segundo tumor primario, en función de la distancia y del tiempo de aparición ¹⁷.

1.6.2 Cambios en genes supresores tumorales y oncogenes en el carcinoma oral de células escamosas

Los **genes supresores tumorales** (*tumor suppressor genes*, TSG) son genes que actúan controlando el crecimiento de las células mediante la regulación del ciclo celular, apoptosis, adhesión celular y reparación del DNA ^{10,14}. El ciclo celular normal incluye la muerte celular programada o apoptosis, y células que evitan que éstas tengan potencial para llegar a ser cancerosas ¹⁰ (Fig. 2).

La inactivación de los TSG puede ocurrir por mecanismos epigenéticos o genéticos ¹⁷. La función de los TSG puede ser alterada por aberraciones como mutaciones o deleciones en los genes de los TSG, o por silenciamiento de los TSG mediante una hipermetilación. Cualquiera de estos cambios puede llevar al desarrollo del cáncer ¹⁴.

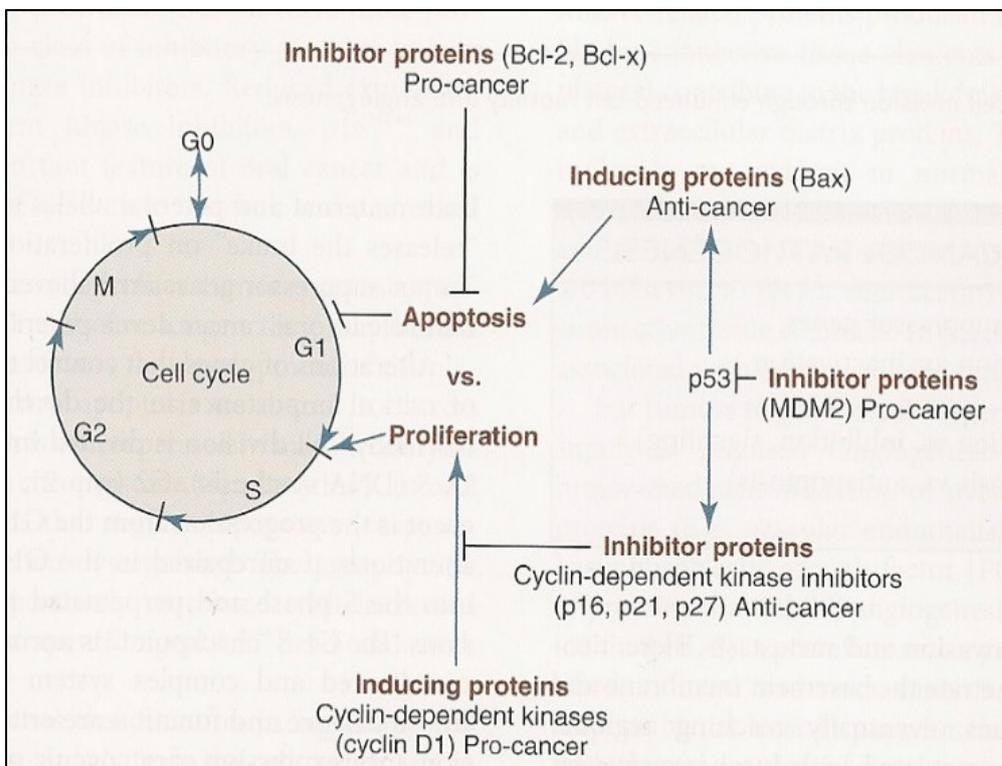


Fig. 2. Regulación del ciclo celular ²¹.

Los TSG afectados con mayor implicación en la carcinogénesis oral son:

- **p53**: es el TSG más frecuentemente afectado en la carcinogénesis oral, y se encuentra localizado en el cromosoma 17p13.1 ^{7,14,23,25}. El gen TP53 se relaciona con la apoptosis y con la regulación del ciclo celular ¹⁰. La mutación del gen TP53 produce una acumulación de la proteína p53 ^{7,23}. Esta alteración ocurre por mutación en una secuencia del TP53, produciendo proteínas alteradas o inactivadas, o también por la producción aberrante de otras proteínas que se encargan de la regulación de la actividad de p53 (como son MDM2 o proteínas virales) ¹⁷. Algunos estudios relacionan las mutaciones de p53 con la exposición a tabaco y alcohol ¹². La sobreexpresión de esta proteína está asociada con una baja supervivencia de los pacientes con carcinoma oral de células escamosas ²³. Además, existe una asociación significativa entre la sobreexpresión de p53 y el tamaño del tumor, presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y un estado más avanzado ²³.
- **p16 o CDKN2**: es el segundo TSG más frecuentemente afectado en la carcinogénesis oral, y se sabe que se encuentra mutado en el 60% de los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral ^{14,24}.

Se trata de una proteína que consiste exclusivamente en cuatro repeticiones de anquirina. Se denomina P16 ^{INK4A} porque actúa como inhibidor de CDK4, o también CDKN2, por su acción inhibidora de CDK2. Esta proteína está codificada por el gen supresor p16 o CDKN2A (dependiente de ciclina inhibidor de quinasa 2A), localizado en el cromosoma 9p21. La proteína p16 ejerce su función normal principalmente inhibiendo las quinasas dependientes de ciclina (complejo ciclina D1/CDK4-6), evitando así la fosforilación de pRB (proteína del retinoblastoma). De esta manera queda secuestrado el factor de transcripción E2F, formando el complejo pRb/E2F (que se forma cuando la proteína pRb se encuentra hipofosforilada), impidiendo así que el factor E2F acceda a los promotores de los genes de proliferación, y deteniendo el ciclo celular en el punto G1/S ^{10,17,23-25}.

Además de la vía pRb/E2F, p16 también contribuye a la progresión del ciclo celular a través de otras vías de regulación alternativas e independientes ²⁴ (Fig. 3).

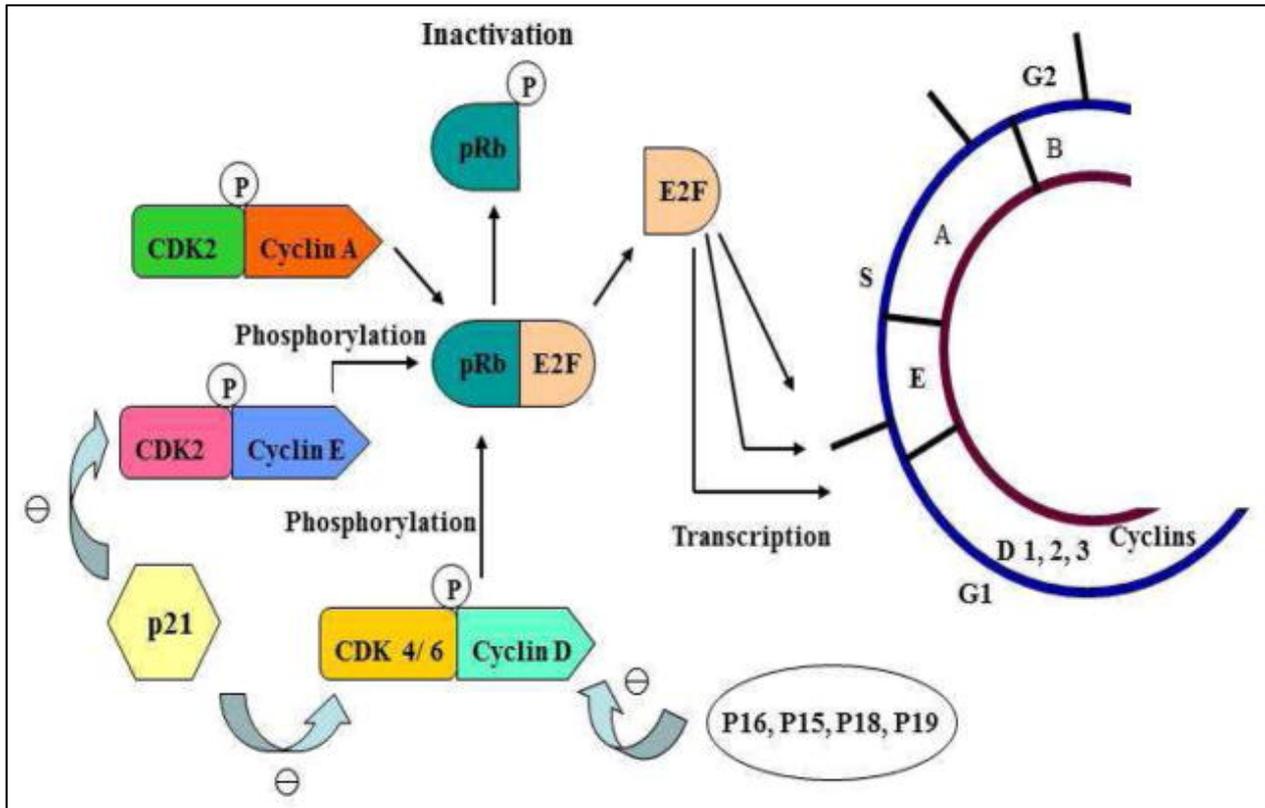


Fig.3. Rutas de señalización p16-CDK4/6-pRb²⁴.

También se ha demostrado que la expresión elevada de p16 inducida por oncogenes como respuesta a un daño en el DNA o por envejecimiento, puede desencadenar y acelerar la senescencia celular²⁴. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que p16 podría estar implicado en la respuesta celular a agentes genotóxicos. Se ha visto cómo después de un daño en el DNA inducido por genotóxico, la elevada expresión de p16 en las células tumorales resultó en la detención del ciclo celular y la inhibición de eventos apoptóticos²⁴.

La inactivación de p16 implica cuatro tipos de alteraciones genéticas: eliminación homocigótica, hipermetilación del promotor, pérdida de heterocigosidad y mutación puntual^{24,25}. Mientras que la supresión homocigótica y la hipermetilación del promotor constituyen la mayoría de las alteraciones de p16, parece ser que existe una preferencia por un tipo

específico de alteración de p16 en ciertos tipos de tumores; por ejemplo, aproximadamente el 30% de las alteraciones de p16 en los carcinomas de células escamosas orales son mutaciones puntuales. Además, la naturaleza de una alteración genética en p16 determina su efecto mutagénico en las funciones p16. Mientras que deleciones homocigóticas y silenciamiento aberrante de p16 mediado por metilación conducen por lo general a la pérdida completa de la función de p16 en las células, mutaciones puntuales solo afectan parcialmente la estructura y la función de p16 ^{24,25}.

Además de la inactivación genética de p16, se dan otros eventos moleculares frecuentes, como son sobreexpresión de la ciclina D1 (CCND1), *gankyrin* (PSMD10), SEI-1 (SERTAD1), CDC6 y NF-κB, los cuales, también conducen a la desregulación de p16 a través de distintos mecanismos. En consecuencia, se deduce que la regulación alterada de p16 en el cáncer está sujeta a la coordinación y suma de alteraciones genéticas de p16, la activación de oncogenes, y cambios en TSG relacionados ²⁴.

La coordinación entre la inactivación genética de p16 y la desregulación de p16 también puede variar con las etapas de desarrollo del cáncer. La inactivación genética de p16 se ha establecido como punto de referencia durante la progresión del cáncer ^{17,24}, aunque queda por dilucidar si este suceso se produce como el estado más temprano de la carcinogénesis. Nuevas evidencias muestran que la desregulación de p16, a través de los oncogenes antes mencionados, se produce durante las etapas más tempranas del desarrollo del cáncer, posiblemente con antelación a las alteraciones genéticas de p16. Se ha visto cómo, por ejemplo, una expresión aberrante de *gankyrin*, independiente de las alteraciones genéticas de p16, puede representar un biomarcador útil para la detección temprana del cáncer ²⁴.

Por otra parte, también se ha observado que esta desregulación de p16 mediada por oncogenes puede tener efectos más profundos que su inactivación genética. Se sabe que alteraciones aberrantes de algunas oncoproteínas (como *gankyrin* y SEI-1), pueden generar consecuencias multifactoriales capaces de modular el crecimiento celular y la progresión carcinogénica de forma independiente ²⁴.

La sobreexpresión de p16 mutado está asociada con un peor pronóstico de varios tipos de cánceres, entre los que se incluye el cáncer oral. Se da hasta en un 55% de los carcinomas de células orales ²⁴. Igualmente, la reducción o la no expresión de p16 están relacionadas con un peor pronóstico en pacientes con cáncer oral. Esto se produce en el 83% de los carcinomas orales de células escamosas y en el 60% de las lesiones premalignas ^{17,23}.

Además de la alteración de estos TSG (que son las más frecuentes), en el cáncer oral ocurren otras más como es el caso del gen p27. Éste se encuentra localizado en el cromosoma 12p13, y codifica una proteína nuclear que se encarga de inhibir la formación del complejo ciclina D1/CDK durante las fases G0 e inicio de G1 del ciclo celular. La disminución de la expresión de p27 ha sido asociada con la progresión, la metástasis y el pobre pronóstico del tumor en varios cánceres ²³.

Hay otros numerosos TSG alterados o silenciados en el proceso de la carcinogénesis (p14, p15, p18, etc.), pero la vía de alteración o silenciamiento podría ser diferente entre los pacientes ^{10,24}.

Los **oncogenes** son genes que contribuyen al crecimiento, supervivencia y propagación de las células; por tanto, pueden participar en el desarrollo del cáncer, ya que, cuando un oncogén es activado, puede promover una proliferación no controlada de las células, resultando así en una carcinogénesis ^{10,12,14}. Dentro del concepto de las bases genéticas de la carcinogénesis, se sabe que, además de la afectación de los TSG, se produce la sobreexpresión de los oncogenes ¹⁰.

Entre estos tenemos:

- **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR):** Es el oncogén más estudiado y aparece sobreexpresado en la mayoría de los carcinomas de células escamosas orales ^{10,12,17,23,26}.

Pertenece a la familia ErbB de receptores tirosina quinasa. Esta familia incluye cuatro miembros, que son: EGFR/erbB1 (HER1), c-erbB2 (HER2/neu), c-erbB3 (HER3) y c-erbB4 (HER4) ^{12,17,26-29}.

El EGFR es una glicoproteína transmembrana que incluye 3 dominios funcionales: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático tirosina quinasa, aunque este último dominio funcional solo lo poseen los receptores EGFR y ErbB4^{12,26-30}. (Fig. 4)

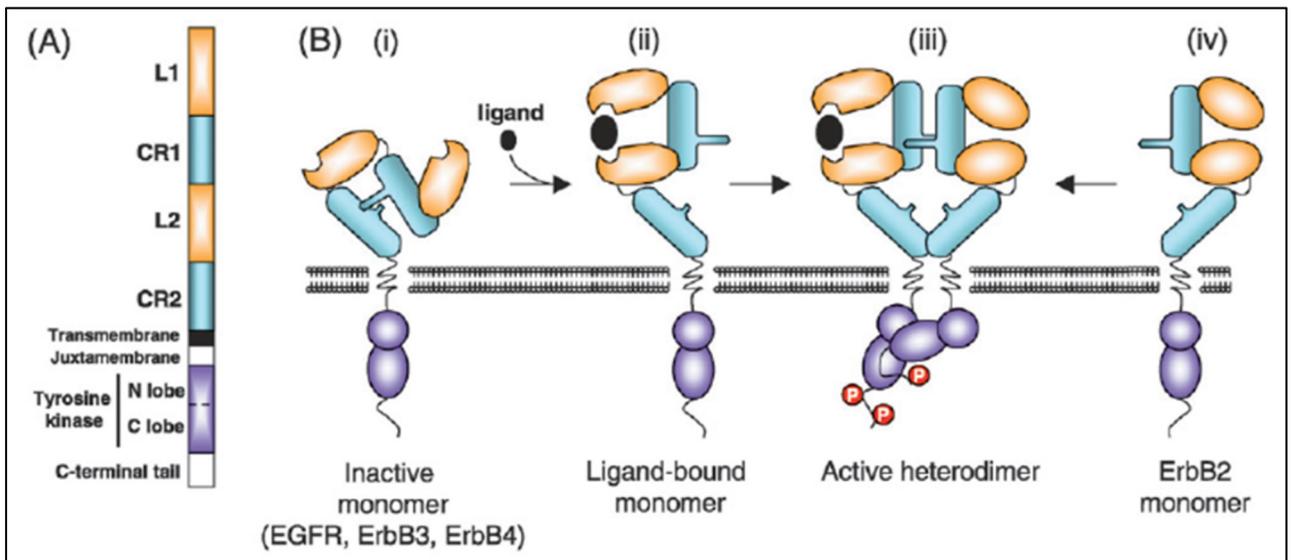


Fig. 4. Estructura de los receptores ErbB²⁹.

Son unos receptores implicados en las vías de señalización comúnmente expresadas en algunos tejidos epiteliales, y juegan un papel importante en la proliferación, supervivencia, organogénesis y reparación de los tejidos de las células de los organismos multicelulares^{12,17,23,27}. Estos receptores traducen las señales extracelulares a través de la activación de mensajeros intracelulares o directamente a través de la translocación del receptor al núcleo²⁹.

En condiciones normales, y en ausencia de ligandos, estos receptores se encuentran en estado inactivado. La activación de los receptores ErbB está controlada por la expresión temporal y espacial de sus ligandos, los cuales son miembros de la familia EGF de factores de crecimiento. Estos ligandos se unen al dominio extracelular, y los miembros de la familia ErbB desencadenan una

compleja y estrechamente regulada dimerización y activación intracelular ²⁷⁻²⁹. La dimerización del receptor es esencial para las funciones de ErbB. El ligando y el receptor unidos sufren dimerización, ya sea como homodímeros o heterodímeros entre miembros de la familia ErbB. En condiciones normales, los receptores ErbB están plegados para inhibir su dimerización, y por lo tanto existen como monómeros ²⁷.

Cuando se produce la unión al ligando, se inducen reordenamientos conformacionales para exponer y estabilizar el dominio de dimerización, favoreciendo de este modo la dimerización del receptor. Después de la dimerización, se produce la fosforilación de los dominios de tirosina quinasa intracelulares. Con esta fosforilación, se inicia la cascada múltiple de señalización intracelular ^{27,30}.

Alternativamente, la transactivación, al menos parcial, de EGFR, también se puede lograr mediante mecanismos intracelulares independientes de ligando, tales como el receptor acoplado a proteína G (GPCR), estimulación de Src o niveles elevados de calcio ³⁰.

Existen numerosos ligandos de la familia EGF. Se pueden dividir en tres grupos. El grupo uno se une específicamente con EGFR, el segundo grupo se une con EGFR y ErbB4, y el tercer grupo se une a ErbB3 y ErbB4, mientras que NRG3 y NRG4 se une solamente a ErbB4 ^{27,29}. (Tabla 2)

EGFR/ERBB Family of Receptor	EGF Family of Ligands
EGFR1	Group 1 - EGF, TGF α , amphiregulin Group 2 - betacellulin, HB-EGF, epiregulin Group 3 - neuregulins (NRG1-4)
erbB2	
erbB3	
erbB4	

Tabla 2. Ligandos de la familia EGF ²⁷.

No se conoce ningún ligando que se una a ErbB2. Sin embargo, un miembro de la familia de las mucinas, MUC4, puede actuar como modulador intramembrana de la actividad de ErbB2. Además, ErbB2, es el preferido por los otros EGFRs para la dimerización ^{27,29,30}.

Recientemente, se han sugerido otros dos nuevos ligandos, *tomoregulin* y *neuroglycan C*, para representar a NRG5 y 6, y que se unen a ErbB4 y ErbB3, respectivamente ^{28,29}.

Una vez activados los diferentes receptores ErbB, se activan distintas vías intracelulares ²⁷ (Fig.5).

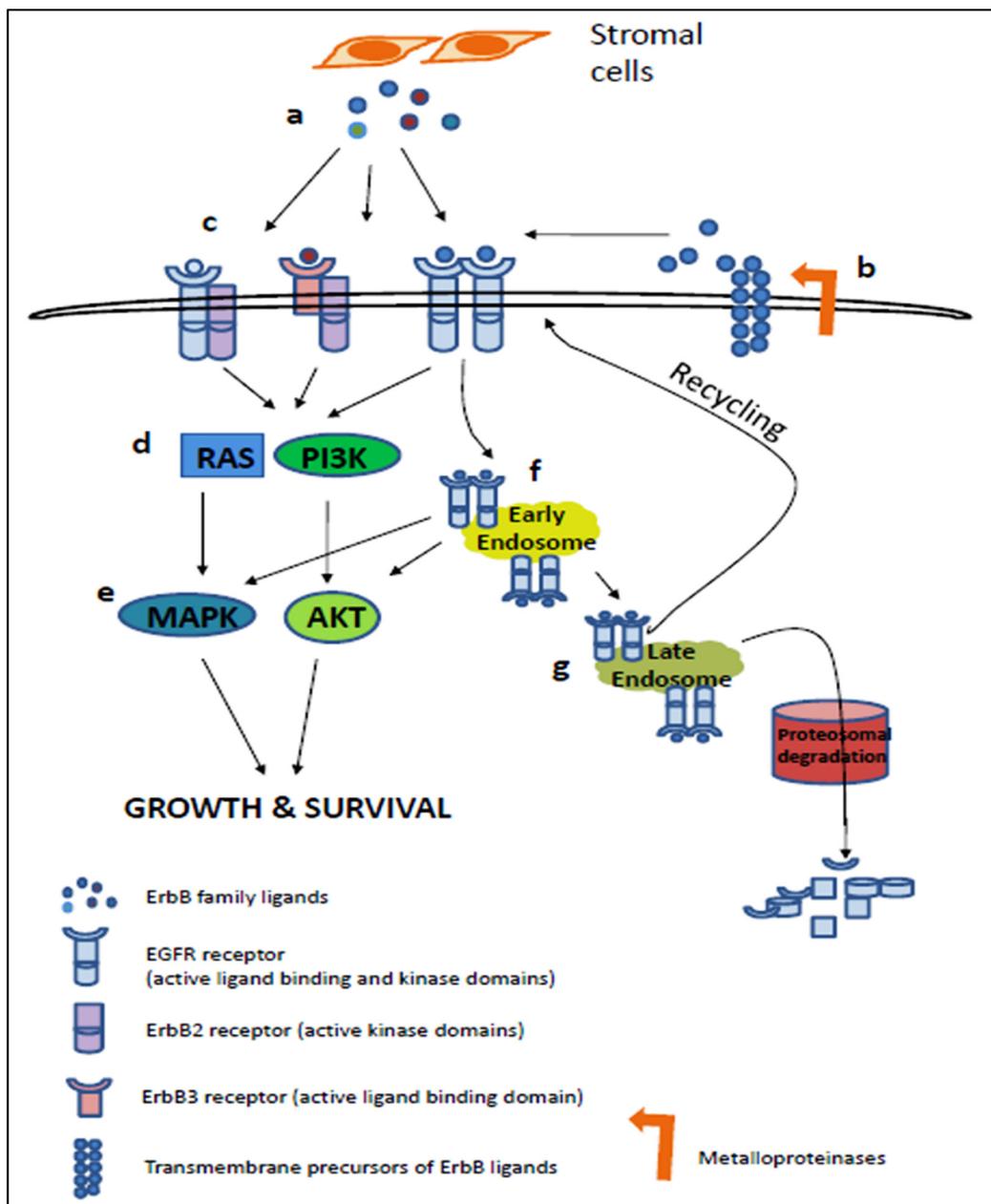


Fig. 5. Activación de receptores ErbB y rutas de señalización intracelular implicadas ²⁷.

Las dos vías de señalización principales moduladas por el sistema ErbB incluyen la vía de las Ras/MAP quininas (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) y la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-AKT. Ambas vías promueven la proliferación celular y la señalización de supervivencia/apoptosis a través de la activación de factores de transcripción y la regulación positiva de la ciclina D1^{27,28}. También modulan la vía PLC γ 1/PKC y la vía STATs, la cual está asociada a la activación de EGFR en el cáncer^{27,29,30}. STAT3, por ejemplo, juega un papel importante en el mantenimiento de la polaridad y la adhesión de la célula epitelial²⁹. STAT3 está frecuentemente sobreexpresado en los carcinomas de células escamosas orales pobremente diferenciados, y también está relacionado con metástasis en los ganglios linfáticos y con un pobre pronóstico¹².

La activación de la vía MAPK lleva a la transcripción de genes que conducen a la proliferación celular, diferenciación, migración y angiogénesis. La activación a través de la cascada PI3K-AKT puede también regular directamente la supervivencia celular y la progresión del ciclo celular, así como el crecimiento celular mediante la activación de una serina / treonina quinasa (mTOR), esencial para el crecimiento y la proliferación celular²⁷.

Los receptores EGFR y ErbB2 activan todas las vías de señalización, mientras que ErbB3 y ErbB4 solo parecen activar la vía PI3K-AKT^{27,29}.

Además de la activación de un número de quininas que participan en la propagación de eventos celulares, la activación de ErbB también inhibe ciertas fosfatasas, tales como la PP2A y DUSPs. Por lo tanto, la activación del receptor ErbB puede conducir la proliferación y la supervivencia mediante la activación de una red de proteínas efectoras y, al mismo tiempo, la inhibición la señalización de los reguladores negativos RTK. Además, la señalización mediada por ErbB puede ser atenuada por reguladores negativos, tales como las proteínas *Sprouty* y *Spred*. Por lo tanto, la activación de la cascada de señalización mediada por los receptores ErbB está estrechamente regulada tanto por regulación positiva como por retroalimentación negativa²⁷.

La expresión aberrante y la activación de los miembros de la familia ErbB, están implicadas en el desarrollo y progresión de muchos tipos de tumores. En algunos tumores, lo que se produce es una sobreexpresión de los ligandos; sin embargo, en otros se expresa una mutación, amplificación o una variante de EGFR como es el EGFRvIII, es cual tiene un reordenamiento del dominio extracelular de manera que no le hace falta la unión al ligando para activarse. La mutación se encuentra más raramente, pero la amplificación ocurre en el 30% de los casos ^{17,27}. En general, EGFR, ErbB2 y ErbB3 están todos implicados en el desarrollo y la progresión del cáncer, mientras que el papel de ErbB4 en la oncogénesis, es el menos conocido ²⁷.

Además de las alteraciones y las mutaciones en la expresión de los receptores ErbB, también juega un papel importante procancerígeno la transactivación oncogénica por el ligando factor de crecimiento epidérmico (EGF). Estos ligandos EGF son producidos como precursores transmembrana, y pueden ser eliminados por proteasas de la superficie celular. Estas proteasas pertenecen a la familia de las metaloproteasas, en concreto a las ADAM y las de la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMPs) ^{27,30}. También se sabe que puede existir la implicación de otros ligandos fisiológicos en la transactivación, como son los WNT ²⁷.

En el caso del receptor EGFR, se encuentra sobreexpresado en el 90% de los cánceres de cabeza y cuello, y esta sobreexpresión está implicada en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. Además, está asociada con un pobre pronóstico, un aumento del crecimiento del tumor, las metástasis y la resistencia a la quimioterapia y radioterapia ^{23,26}.

Algunos autores encuentran relación entre la expresión de EGFR con el estado de avance del tumor, la presencia de metástasis y el grado del tumor, incluso con una sensibilidad reducida a la radiación, y un aumento en el riesgo de la repetición en pacientes con carcinoma de células escamosas oral ^{12,23}. Por el contrario, otros autores concluyen que la expresión de EGFR no proporciona información adicional sobre el estado clínico-patológico del paciente con cáncer oral. Sin embargo, los tumores con expresión de EGFR de membrana y citoplasmático están asociados con la presencia de invasión vascular ²³.

Uno de los aspectos más importantes de EGFR es la posibilidad de usarlo como objetivo de la terapia anticancerosa para los tumores con sobreexpresión de esta proteína. Se han investigado numerosas estrategias para inhibir el EGFR, incluyendo anticuerpos monoclonales (por ejemplo, *cetuximab*), inhibidores de la tirosina quinasa (*gefitinib*, *erlotinib*), anticuerpos radiomarcados, toxina-ligando conjugadas e inmunoconjugados. Todos ellos podrían usarse en combinación con otras terapias convencionales, como la radioterapia^{23,27,29}.

- **Ciclina D:** se encuentra localizada en el cromosoma 11q13, una región comúnmente amplificada en el carcinoma de células escamosas oral^{25,31}. Las ciclinas son un grupo de proteínas que regulan la división celular normal³¹. La expresión de las ciclinas Ds (D1, D2 y D3), están controladas por la influencia de los factores de crecimiento extracelulares; cuando se eliminan estos mitógenos, se evita la acumulación de ciclina Ds y son degradadas rápidamente; de este modo, la progresión del ciclo celular queda detenida en el punto de restricción en la fase G1^{17,24}.

La sobreexpresión de las ciclinas Ds, especialmente ciclina D1, se ha encontrado frecuentemente en muchos cánceres humanos, y es común tanto en el carcinoma de células escamosas oral como en las lesiones premalignas. Además, la sobreexpresión está relacionada con la severidad de la enfermedad, incluyendo estado del tumor, implicación de ganglios linfáticos y agresividad del carcinoma de células escamosas. La amplificación y sobreexpresión de la ciclina D1 implica un pronóstico y supervivencia pobres. Además, esta sobreexpresión es un evento temprano en la carcinogénesis oral^{17,24,25,31}.

La sobreexpresión de las ciclinas Ds en las células conduce a un aumento de la fosforilación de pRb mediada por CDK4, promoviendo así la progresión del ciclo celular mediante la aceleración de la transición de la fase G1/S, lo que demuestra que la ciclina D1 es limitante de la velocidad en este paso^{24,25}. La aceleración a través del punto de control de G1 debida a la sobreexpresión de ciclina D1 se ha demostrado que provoca un aumento en la inestabilidad genómica²⁵.

Existen más oncogenes implicados en la carcinogénesis, pero, al igual que ocurre con los TSG, el alcance de los oncogenes identificados es bastante amplio y sus mecanismos de acción parecen complejos ¹⁰.

1.7 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

La infección con HPV podría asociarse con diferentes enfermedades de la cavidad oral ³². Estas lesiones orales por HPV pueden tener apariencia clínica diferente, desde benignas lesiones hiperplásicas, papilomatosas o verrucosas, hasta cambios carcinomatosos ³². Mientras algunos tipos de HPV oncogénicos han sido identificados en la cavidad oral, la mayoría de las infecciones orales de HPV no progresan a enfermedad neoplásica ³³ (Tabla 3).

Oral disease	human papilloma virus types
Verruca vulgaris	2,4
Condyloma lata	6,11
Squamous papilloma	6,11
Focal epithelial hyperplasia	13,32
Oral leukoplakia	16,18
Verrucous carcinoma	6,11,16
Oral squamous-cell carcinoma	16,18
Laryngeal papilloma	6,11,30
Maxillary sinus papilloma	57

Tabla 3. Enfermedades orales y asociación con los genotipos de HPV ³²

El HPV pertenece a la familia Papillomaviridae ³⁴. Son virus no encapsulados, con cápside icosaédrica, de pequeño tamaño y con un genoma de DNA circular bicatenario ^{3,5}. Codifican proteínas que estimulan la proliferación celular, lo cual facilita la replicación vírica lítica en las células permisivas, aunque puede provocar una transformación oncogénica en las células no permisivas ³⁵.

El genoma del HPV se divide en tres partes: una región temprana, que codifica las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, relacionadas con la regulación de los genes virales (replicación y transcripción) y con la transformación de la célula huésped; una región tardía, que se expresa como las proteínas estructurales L1 y L2 (encargadas de formar el armazón del virus); y una tercera región de regulación de las secuencias de DNA ^{3,5,32,34} (Fig. 6).

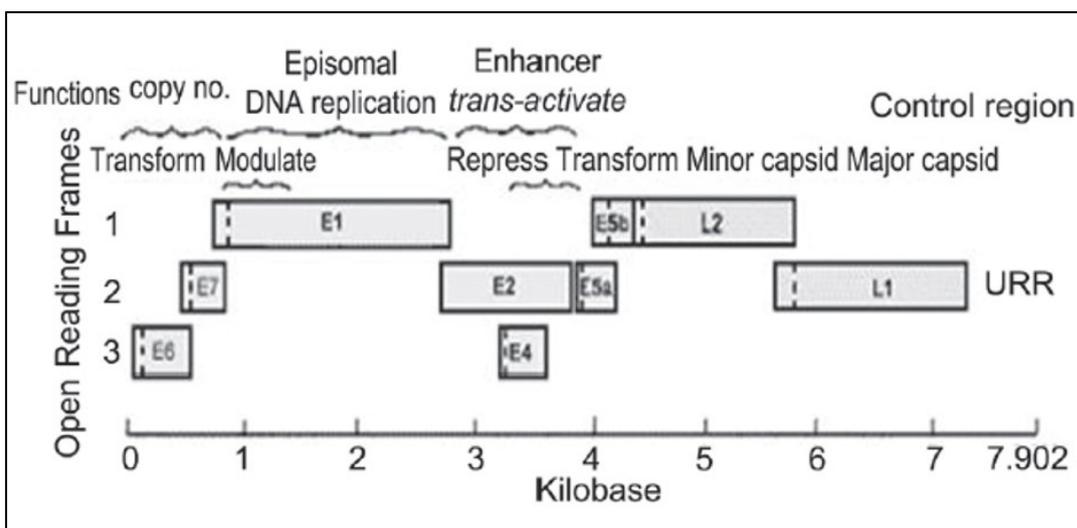


Fig. 6: Genoma del HPV ³².

Se han identificado más de 100 tipos, clasificados en 16 grupos (A P). También se pueden dividir en HPV mucosos, que tienen tropismo por las mucosas tanto oral como genital y donde se incluyen los también clasificados como *Alphapapillomavirus* (α -HPV); o HPV cutáneos, que tienen tropismo por la piel y donde se incluyen los *Betapapillomavirus* (β -HPV) y los *Gammapapillomavirus* (γ -HPV) ^{5,8,13,33,35,36}.

También se clasifican según se consideren de “bajo riesgo” (no oncogénicos) o de “alto riesgo” (oncogénicos) de malignidad, según si están asociados a lesiones proliferativas benignas, como son condilomas o verrugas, o malignas, como los carcinomas de células escamosas ^{3,7,33,34,36}. Los de alto riesgo son

conocidos por causar cáncer de cérvix uterino, ano, vagina, vulva, pene y de cabeza y cuello ⁵.

Tanto los de bajo como los de alto riesgo pueden causar el crecimiento de células anormales; pero solo los de alto riesgo pueden producir cáncer, ya que únicamente la proteína E7 codificada por los HPV de alto riesgo puede inmortalizar las células del epitelio humano ³. Estas variaciones genotípicas en las secuencias del DNA de E6 y E7 son las que permiten la estratificación de los fenotipos de los virus oncogénicos en bajo o alto riesgo ³².

Los tipos 1-15, 17, 19-30, 32, 34, 36-44, 46-51, 53-57 y el 59 son considerados de bajo riesgo, mientras que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 y 52 son considerados de alto riesgo de producir lesiones malignas ^{7,11}.

La transmisión del virus puede ser vertical, a través de la infección cervical de la madre, pero la mayoría de la transmisión es horizontal. Esta transmisión horizontal es por contacto directo, ya sea sexual o no sexual. También es posible el contagio por autoinoculación de una localización a otra ³².

Una vez que el virus está en contacto con la piel, colándose a través de heridas o abrasiones, va pasando por las distintas capas hasta llegar a la capa basal del epitelio, que es la única proliferativa. A través de un receptor celular específico, se introduce en las células basales del epitelio, alcanzando el núcleo. El incremento del número de células inducido por el virus provoca un engrosamiento del estrato espinoso y de la capa basal. Una vez dentro de la célula, el genoma viral permanece en forma episomal, es decir, circularizado y no integrado en el genoma celular. A partir de aquí, el virus va madurando con la diferenciación de estas células hasta su estadio de queratinocito terminal, donde se va a replicar haciendo que las células más superficiales se transformen en coilocitos. Estos coilocitos, característicos de la infección por papilomavirus, son queratinocitos hipertrofiados con halos transparentes que rodean los núcleos arrugados. El virus no es lítico, es decir, no produce la rotura de la célula infectada, sino que contagia a otra persona por desprendimiento de esos coilocitos y su contacto posterior con el epitelio no infectado, ya que el virus aprovecha la maduración de las células de la piel

para atravesar las capas cutáneas y desprenderse con las células muertas de la capa superior ^{3,35,36} (Fig.7).

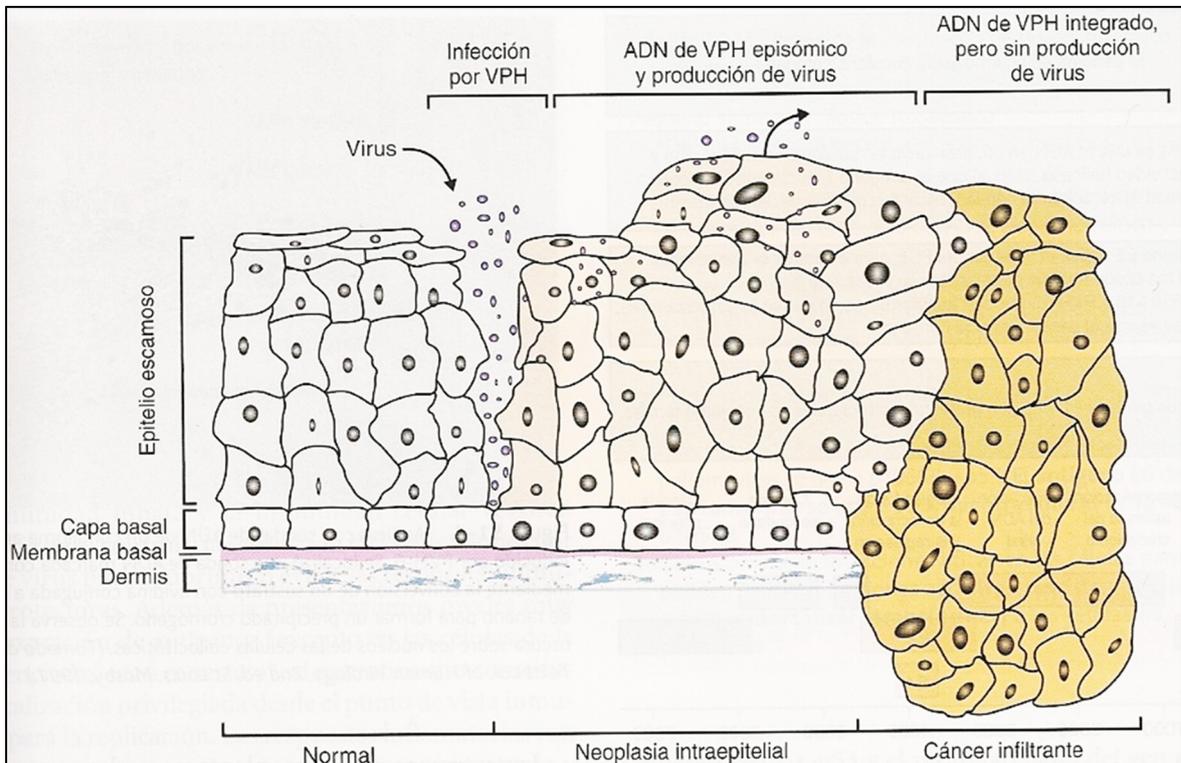


Fig. 7: Progresión del carcinoma mediado por HVP ³⁵.

Las bases moleculares más importantes de este fenómeno involucran a varios genes virales. Por ejemplo, las proteínas codificadas por los genes E1 y E2 son críticas para la replicación del DNA viral. E4 se asocia a los filamentos intermedios de citoqueratina y los desestabiliza, lo que facilita la liberación de partículas virales. E2 también se asocia a los genomas virales con los cromosomas celulares en mitosis, lo que garantiza que esos genomas no se pierden durante la división celular. E5, E6 y E7, considerados oncogenes, promueven la proliferación celular incontrolada para permitir la amplificación viral, pero también contribuyen a la iniciación y a la progresión del cáncer a través del mismo mecanismo y mediante la inducción de la inestabilidad

genómica. Por último, L1 y L2 son las proteínas estructurales que terminarán el proceso de maduración del virus ^{5,7,36,37}.

Como se ha mencionado anteriormente, en el ciclo productivo del HPV, el genoma viral se encuentra en bajo número de copias en el núcleo de las células basales y en forma episomal, pero este estado es variable. Por factores desconocidos, en un momento determinado, el virus provoca la integración de su genoma al genoma celular (los HPV de alto riesgo). Esto ocurre al azar, pero esta inserción se observa con frecuencia cerca a los denominados “sitios frágiles” cromosómicos, que son sectores del DNA celular que tienden a romperse con más facilidad que otros, y provocan un fenotipo mutado ^{32,36}.

En los HPV de alto grado de malignidad, como son los tipos 16, 18 o 31, la inserción al genoma celular se hace a través del gen viral E2, el cual, normalmente, actúa inhibiendo la expresión de los genes virales E5, E6 y E7. Cuando ese genoma se integra, E2 sufre deleciones que lo inactivan, aunque esto no evita la expresión de otros genes víricos como son el E6 y E7. Estos genes, ya fuera del control de E2, se convierten en oncogenes ^{3,32,32,35,36}.

E7 activa la síntesis de DNA y los mecanismos de replicación celular que están inactivados normalmente en las células epiteliales maduras, y así se inicia el crecimiento celular patológico. Mediante la inducción de la supervivencia celular y el bloqueo de la apoptosis de células con daño en el DNA, E6 permite a E7 ejercer y mantener su efecto patológico ^{3,34}.

Por otro lado, E6 se asocia a la proteína p53 y, simultáneamente, activa la transcripción de la enzima telomerasa. Al mismo tiempo, E7 se une a la proteína pRb e inhibe su función, permitiendo que se libere el factor de transcripción E2F, que estimula la división celular. Como consecuencia, estas cepas actúan, por una parte, destruyendo a p53 y permitiendo la acumulación de DNA mutado, activando la telomerasa y produciendo eventualmente la immortalización celular; además, inhibe a uno de los controles del ciclo celular (pRb), con lo que la célula immortalizada y con mutaciones en su DNA entra constantemente en el ciclo celular. Además, E7 actúa uniéndose e inhibiendo a las proteínas p21 y p27 ^{7,8,32,34-36} (Fig. 8).

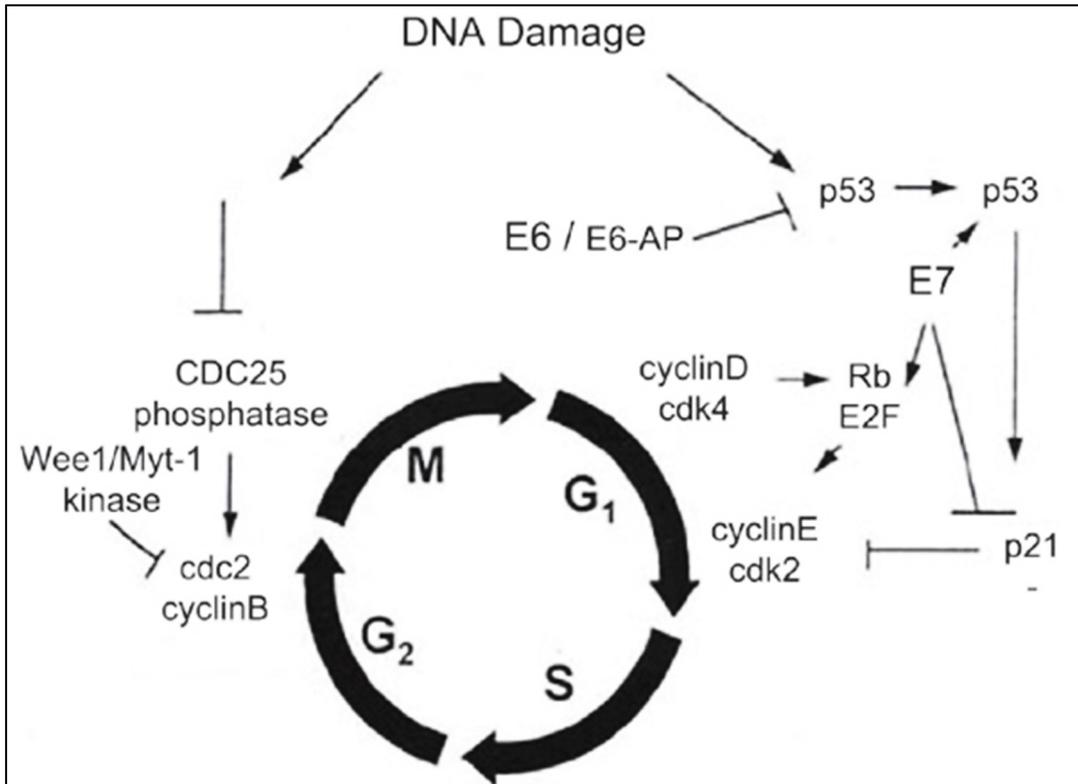


Fig. 8. Modelo de interacción de E6 y E7 del HPV ³².

E6 y E7 pueden cooperar con oncoproteínas como ras y myc, las cuales permiten al virus actuar a nivel de factores de crecimiento y metabolismo celular y nuclear, produciendo células oncogénicas. Además, E6 y E7 pueden provocar mutaciones en el DNA de la célula huésped, probablemente por causar alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA. Esto significa que ciertos tipos de HPV son capaces de causar lesiones malignas incluso sin la acción de otros cofactores ³².

En la infección por HPV también se produce una desregulación de la proteína p16 por la pérdida del control de retroalimentación negativo de la expresión de pRb. Esto tiene como resultado una sobreexpresión de la proteína p16, lo cual está extensamente documentado en los carcinomas HPV positivos y se considera un marcador sustituto útil de carcinomas relacionados con la infección de HPV ³².

En el caso de las cepas no oncogénicas, las secuencias de los genes E6 y E7 no son similares, y, por consiguiente, estos genes intervienen en el ciclo productivo del virus, pero no degradan a p53 ni a pRb ³⁶.

Hay estudios en los que se sugiere que la inactivación de pRb por E7 podría ser el principal evento en el desarrollo del carcinoma de células escamosas oral ²⁵.

La respuesta inmune del huésped contra el HPV no está completamente clara. Se ha encontrado en las células de la capa basal la expresión de antígenos virales tempranos, mientras que antígenos virales tardíos se forman en la capa epitelial queratinizada superficial ³.

Además, se han demostrado ambos tipos de respuesta inmune (con anticuerpos y la mediada por células). Los anticuerpos contra HPV pueden ser del tipo de IgA, IgM o IgG, alcanzando los niveles máximos a los 6 o 12 meses después del inicio de la infección. La existencia de anticuerpos contra E4 está asociada con la replicación viral y con el primer contacto del huésped con el HPV. La regresión de las lesiones de HPV está asociada con una respuesta histológica característica con la participación de linfocitos T y macrófagos. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, la posibilidad de infección del virus de alto riesgo aumenta debido a la falta de respuesta inmune, al efecto oncogénico de los fármacos administrados y a la estimulación antigénica crónica ³².

1.8 RELACIÓN ENTRE HPV Y CÁNCER ORAL

La asociación entre HPV y lesiones de células escamosas en varias localizaciones del cuerpo, incluyendo la cavidad oral, fue descrita por primera vez por Syrjänen et al. en 1983 ³⁸, aunque previamente en 1976, Zur Hausen ³² ya postuló el papel del HPV en el cáncer de cérvix. Los resultados sugerían que el HPV podría ser el agente implicado en el desarrollo de al menos ciertos tipos especiales de carcinomas de células escamosas orales. En 1985, en

Alemania ³⁹, fue detectado por primera vez DNA de HPV en el carcinoma de células escamosa oral ^{3,32,38,39}.

En los siguientes años, la literatura proporciona además evidencia cuantitativa de que la infección oral con HPV, particularmente con los genotipos de alto riesgo, es un importante factor de riesgo independiente de carcinoma de células escamosas oral ³. Sin embargo, mientras que la relación entre la infección con HPV 16 y 18, y el cáncer de orofaringe está bien establecida como factor de riesgo, en el caso del cáncer de la cavidad oral hay una asociación menos fuerte ^{6,18}.

La prevalencia de la detección de DNA de HPV en los tumores varía entre distintos estudios en función de la población estudiada, combinación de los sitios, tipo de muestra y el método de detección del DNA ¹¹. De todas formas en un meta-análisis realizado por Jayaprakash et al. en 2011, se apoya la hipótesis de que la infección de HPV-16/18 podría ser factor de riesgo no solo para el cáncer de orofaringe, sino también para el cáncer de la cavidad oral ¹⁸.

Se ha estimado que aproximadamente el 0,4% de la población tiene verrugas exofíticas y condilomas en la mucosa oral, mientras que la infección podría estar latente en un 12% de sujetos con una mucosa clínicamente sana ¹³.

La realización de test de hibridación *in situ* ha mostrado que aproximadamente un 50% de los carcinomas de células escamosas, tanto de la cavidad oral como de la orofaringe, son positivos a la infección por HPV. El tipo oncogénico más común es el HPV-16 junto con HPV-18, aunque en la cavidad oral se han aislado al menos 30 tipos de HPV. En mucosa oral normal se ha encontrado los HPV tipo 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 33 y 35, aunque no se sabe el significado de estos HPV en la mucosa aparentemente sana; y en lesiones benignas y malignas orales se han detectado los HPV tipo 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72 y 73 ^{3,6,8,13,18,33,34}. Los tipos más comúnmente asociados con condilomas orales benignos y papilomas benignos son los HPV tipo 6 y 11. Con menor frecuencia aparecen verrugas orales en forma de hiperplasia epitelial focal y verrugas

orales que son causadas por los HPV tipos 13 y 32 y HPV tipos 2 y 4, respectivamente ³³.

Las zonas de la cavidad oral donde la prevalencia de HPV parece ser mayor son la lengua y el suelo de la boca ^{6,11}. Por otra parte, los tumores que son HPV positivos tienen un mejor pronóstico que los que son HPV negativos y que son atribuidos al consumo de tabaco o alcohol ^{6,33}.

Un estudio realizado en Estados Unidos muestra que la incidencia de carcinoma de células escamosas aumenta en las zonas de la cavidad oral relacionadas con la infección de HPV, mientras que se produce una disminución en las zonas de la cavidad oral no relacionadas con la infección del HPV. Este aumento en la prevalencia de la infección de HPV puede estar asociado a los cambios en las conductas sexuales de las generaciones jóvenes con múltiples parejas y práctica de sexo oral ⁶. El riesgo de aislar HPV de la cavidad oral es 8 veces mayor en entre individuos con experiencias sexuales que entre los inexpertos ⁵. La transmisión sexual podría explicar la relación entre el cáncer de la cavidad oral y los comportamientos sexuales. La infección por HPV-16 en cáncer de cavidad oral es más frecuente en individuos con una edad temprana de debut sexual, con múltiples parejas sexuales y con práctica de sexo oral ^{5,11}.

Se consideran por tanto factores que aumentan el riesgo de padecer un carcinoma de células escamosas positivo a HPV, una pobre higiene oral, la práctica de sexo oral y un estado sistémico de inmunosupresión ⁷.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Según la literatura existente, la relación del HPV como factor etiopatogénico del carcinoma de células escamosas de orofaringe está claramente demostrada. Sin embargo, existe gran controversia sobre la relación del HPV como factor etiopatogénico del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.

Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio es determinar si existe tal relación, haciendo un estudio de muestras de carcinoma de células escamosas de distintas localizaciones de la cavidad oral exclusivamente a lo largo de un período de seis años y medio.

Con esto, si se demuestra esta relación, podríamos ver posteriormente cómo se pueden ver afectados tanto el tratamiento como el pronóstico del carcinoma de células escamosas de estos casos, en comparación con los carcinomas originados por otros factores etiológicos, como pueden ser el tabaco y el alcohol.

3. MATERIAL Y METODO

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 MATERIAL

Este estudio se ha llevado a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

Usando la base de datos de los pacientes de este hospital, hemos hecho una búsqueda de historiales, desde el 01/01/2007 hasta el 01/07/2013, de todos los pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral.

Por lo tanto, hemos tomado las referencias de los carcinomas de células escamosas de estos años siguiendo la nomenclatura del hospital pero teniendo en cuenta las zonas que nosotros antes hemos definido como cavidad oral, a saber: lengua, paladar, encía, mucosa bucal, suelo de la boca, trigono retromolar bucal, tejido periapical dental y diente, dejando excluidos, por tanto, las zonas de la orofaringe, las glándulas salivares y los labios.

Las muestras buscadas han sido tanto biopsias como piezas quirúrgicas. Además, a la hora de realizar la búsqueda no hemos tenido en cuenta otros factores etiológicos, como pudieran ser el tabaco o el alcohol, ya que en principio lo que queremos ver es si existe o no infección por el HPV.

El resultado de esta búsqueda ha sido un total de 295 muestras, las cuales, si las dividimos por año, serían:

- Año 2007: 41 muestras, de las cuales tenemos 13 de suelo de boca, 5 de mucosa bucal, 5 de encía y 18 de lengua.
- Año 2008: 39 muestras, de las cuales tenemos 7 de suelo de boca, 4 de mucosa bucal, 5 de encía y 23 de lengua.
- Año 2009: 49 muestras, de las cuales tenemos 9 de suelo de boca, 5 de mucosa bucal, 7 de encía, 5 de paladar y 23 de lengua.
- Año 2010: 45 muestras, de las cuales tenemos 7 de suelo de boca, 7 de mucosa bucal, 8 de encía, 22 de lengua y 1 sin localización específica.

- Año 2011: 57 muestras, de las cuales tenemos 9 de suelo de boca, 5 de mucosa bucal, 12 de encía, 2 de paladar, y 29 de lengua.
- Año 2012: 38 muestras, de las cuales tenemos 8 de suelo de boca, 1 de mucosa bucal, 8 de encía y 21 de lengua.
- Año 2013 (hasta 01/07/2013): 26 muestras, de las cuales tenemos 6 de suelo de boca, 1 de mucosa bucal, 4 de encía y 15 de lengua.

Si estas muestras las clasificamos por su localización en la boca, tenemos:

- Lengua: 151 muestras
- Boca suelo: 59 muestras
- Encía: 49 muestras
- Boca mucosa: 28 muestras
- Paladar: 7 muestras
- Sin especificar: 1 muestra

No se han encontrado muestras en las localizaciones trigono retromolar, diente ni tejido periapical dental.

De cada biopsia se examinan todos los cortes que hay de la misma; de este modo, valoramos al microscopio cuál es el que está en mejor estado para realizarles las distintas pruebas posteriores.

3.2 MÉTODO

Del corte seleccionado previamente, se localiza el bloque correspondiente, del cual se sacan tantos cortes como pruebas se van a realizar, y se montan en los portaobjetos. En principio, montamos tres cortes, en los que se determina:

- La sobreexpresión de la proteína p16 ya que se considera un biomarcador de la actividad de la oncoproteína E7 del HPV que inactiva la actividad de pRb en el ciclo celular, como se ha mencionado.
- La infección por HPV de la familia 6 y 11 (benignos).
- La infección por HPV de la familia 16 y 18 (malignos).

Todas estas determinaciones se hacen mediante la ayuda de la máquina *BenchMark Ultra* de Roche (Fig. 9), la cual realiza de forma totalmente automatizada técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ*.



Fig. 9. Benchmark Ultra, Roche

La determinación de la sobreexpresión de la proteína p16 se ha realizado mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ combina técnicas histológicas, inmunológicas y bioquímicas para la identificación de componentes específicos de tejido, por medio de la reacción específica antígeno-anticuerpo. Esto permite visualizar la distribución y localización de componentes celulares específicos dentro de una célula o tejido.

En nuestro caso, la IHQ se basa en la reacción del complejo avidina-biotina. Este es un método inmunohistoquímico indirecto, en el cual, la señal del anticuerpo se amplía incorporando sucesivas capas de anticuerpos o marcadores. Este método se basa en la fuerte afinidad de la avidina hacia la vitamina biotina. Básicamente, consiste en que al anticuerpo primario se le añade un anticuerpo secundario ligado a una molécula de biotina.

Posteriormente se pone en contacto con un complejo constituido por avidina-peroxidasa, y estas moléculas de avidina se unirán a las moléculas de biotina que están ligadas al anticuerpo secundario, facilitándose de este modo la detección de la señal.

La determinación de la infección por ambas familias (benigna o maligna) de HPV se hace mediante hibridación *in situ* (ISH). Con esta técnica, usando sondas específicas de DNA marcadas, se detecta si existe o no el DNA del HPV en el corte del tejido, confirmando así o no la infección de la muestra por el HPV.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

A la hora de valorar los resultados obtenidos al microscopio, hemos considerado tres posibilidades:

- Negativo, en el caso de una respuesta negativa en todo el conjunto de la muestra.
- Positivo focal, en el caso de positividad solo en alguna zona puntual de la muestra.
- Positivo, en el caso de una respuesta positiva difusa en todo el conjunto de la muestra.

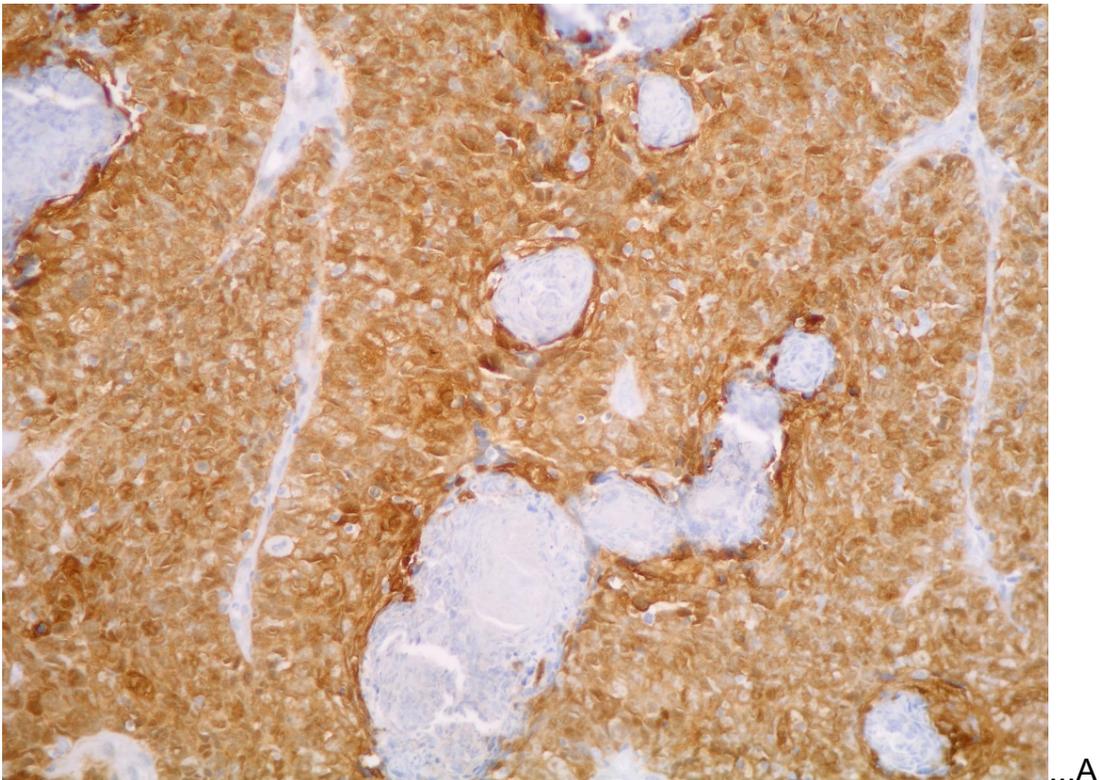
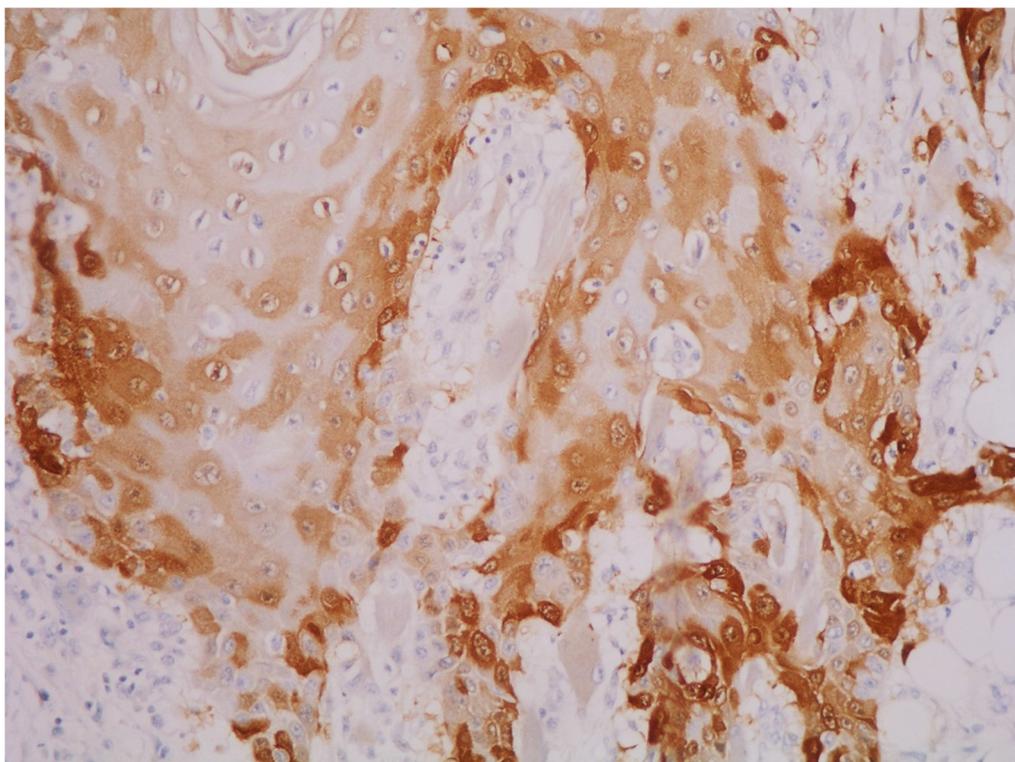
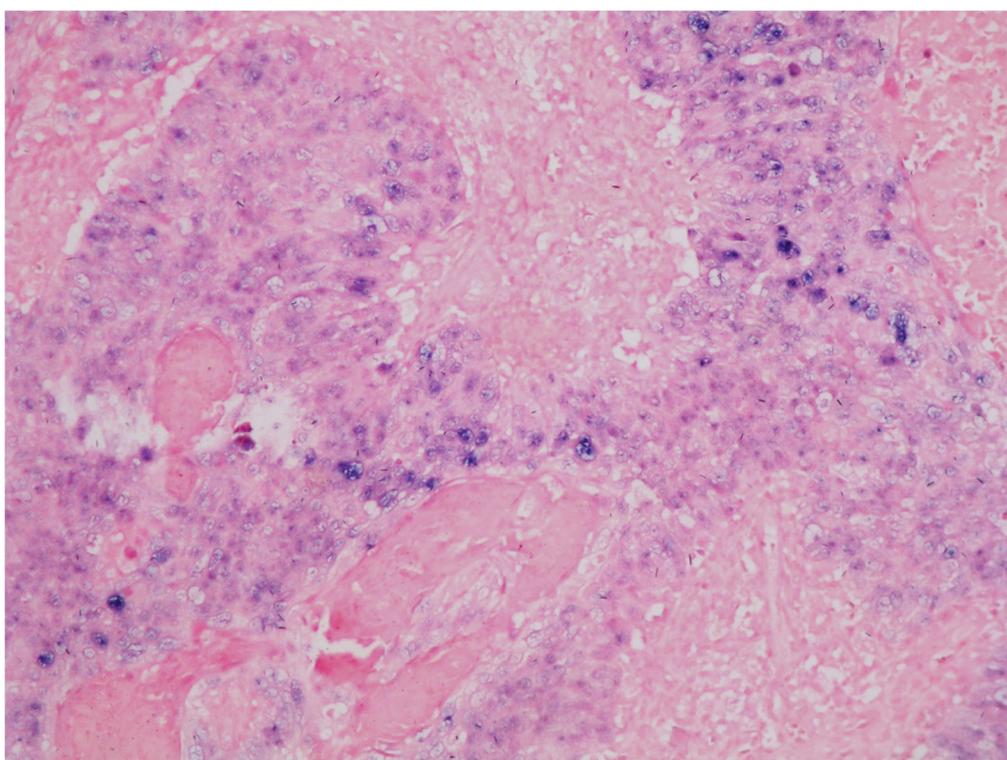


Fig. A. Inmunotinción difusa de las células neoplásicas para p16 (IHQ, 200X)



B

Fig. B. Inmunotinción focal de las células neoplásicas para p16 (IHQ, 200x).



C

Fig. C. Células neoplásicas positivas para el HPV de alto riesgo (ISH, 200x).

Hemos analizado un par de muestras de cada localización de un par de años, y los resultados son los siguientes:

Año 2007:

	p16	HPV II	HPV III
Mucosa oral 1	-	-	-
Mucosa oral 2	-	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Lengua 1	+	-	-
Lengua 2	-	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Encía 1	-	-	-
Encía 2	-	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Suelo boca 1	-	-	-
Suelo boca 2	+ focal	-	-

Año 2008:

	p16	HPV II	HPV III
Suelo de boca 1	+	-	+
Suelo de boca 2	+	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Mucosa oral 1	+ focal	-	-
Mucosa oral 2	+ focal	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Encía 1	+	-	-
Encía 2	+ focal	-	-

	p16	HPV II	HPV III
Lengua 1	-	-	-
Lengua 2	+ focal	-	-

De un total de 16 muestras analizadas hemos obtenido los siguientes resultados:

- p16: negativo 7, positivo 4 y positivo focal 5.
- HPV familias 6 y 11: negativo 16.
- HPV familias 16 y 18: negativo 15 y positivo 1.

El único caso de las 16 muestras que dio positivo a HPV familias 16 y 18, también fue positivo a la determinación de la p16.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Al igual que lo descrito en la literatura, al realizar nuestra búsqueda de las muestra de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral hemos observado cómo la lengua es la localización de mayor prevalencia ^{9,10}. En nuestro estudio hemos visto que, de un total de 295 muestras, 151 se encuentran localizadas en la lengua.

Como ya hemos dicho con anterioridad, la infección por HPV es una causa importante en el caso del carcinoma de orofaringe; sin embargo el papel del HPV en la carcinogénesis de la cavidad oral (estrictamente definida como tal) sigue siendo muy debatida, tanto por la amplia gama de prevalencia viral (que abarca desde el 0% al 100%) ^{40,41}, como por el hecho de que se haya identificado HPV de alto riesgo en mucosa oral normal. Aparte de las diferencias étnico-geográficas y socio-conductuales, esta amplia gama de prevalencia podría estar relacionada con la clasificación errónea de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral con respecto al carcinoma de células escamosas de la orofaringe, así como con el tipo de muestra usada para el análisis, y la diferente sensibilidad y especificidad de los distintos métodos de diagnóstico y de detección de HPV utilizados ^{34,40,41}.

En cuanto a la metodología usada, en este trabajo hemos usado muestras de zonas exclusivamente de las definidas como cavidad oral. Hemos realizado todos los estudios sobre cortes realizados a las biopsias de los carcinomas. Sabemos que la biopsia sigue siendo uno de los procedimientos más comunes de toma de muestras por vía oral, usando la misma muestra tanto para el examen morfológico, así como para la prueba de HPV, incluso en un período de tiempo diferente. Por otra parte, la biopsia proporciona una muestra más representativa de la mucosa oral en comparación con otros procedimientos como la citología exfoliativa, ya que la biopsia incluye las células de la capa basal, donde el virus puede estar presente en una forma latente ⁴⁰.

Además, Syrjanen et al. ³⁴ señalan que la asociación de HPV con el carcinoma de células escamosas oral es significativa solo cuando se detecta el HPV en las muestras de biopsias. Esta asociación significativa se pierde

completamente cuando solo se utiliza citología exfoliativa para analizar el HPV. Por lo tanto, estos autores llegaron a la conclusión de que, para obtener los resultados más precisos, solo los tejidos biopsiados deben ser utilizados para los test del HPV ⁴⁰.

Por otra parte, también es importante la calidad de la muestra, como el hecho de que esté congelada o fijada. Termine et al. (1988-2007) demostraron en su meta-análisis que la tasa de detección del HPV con ISH fue mayor en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina ^{34,42}.

En cuanto a los métodos de detección del HPV, nosotros hemos usado la ISH. Antes de la era de las técnicas moleculares era común el uso de pruebas serológicas para la detección de virus. En estos casos, la seropositividad solo significa que ha habido un contacto pasado o presente con el virus, pero no nos indica nada sobre el sitio exacto de la infección. En el caso de la detección de HPV, las pruebas serológicas son métodos poco fiables por su reducida sensibilidad y especificidad ^{7,34}.

La principal ventaja de las técnicas moleculares es su alta sensibilidad y especificidad ⁷. Para la determinación del HPV existen distintas técnicas moleculares que se dividen, de manera general, en técnicas que son no amplificables y las que usan amplificación. Dentro de las que no requieren amplificación encontramos la ISH y el *Southern Transfer Hybridization* (STH). A su vez, de manera general se pueden dividir las técnicas que usan amplificación en tres grupos: 1. *Target amplification* entre las que se encuentra la PCR (*polimerase chain reaction*), 2. *Signal amplification* entre las que se encuentran *Hybrid capture* y *Gene expression* (DNA microarray) y 3. *Probe amplification*. En la literatura existente se encuentran estudios realizados con PCR, ISH, *Southern*, e incluso algunos que usan PCR y ISH conjuntamente, entre otros ^{18,32}.

La ISH se hace directamente sobre muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina obtenidas a partir de una biopsia. Tiene la ventaja de darnos la información de si el HPV está presente y, en caso afirmativo, dónde se encuentra localizado el DNA del HPV en el tejido. Tiene una desventaja, y es su baja sensibilidad en comparación con la PCR. La ISH tiene un límite de

detección de 20 virus por células infectada, con lo que lesiones de alto grado (que a veces contienen menor número de virus) son no siempre sensibles a esta técnica. Además, es una prueba que consume más tiempo ^{7,32}.

Al igual que la ISH, en el caso del *Southern blot hybridization* (SBH), su principal desventaja es la baja sensibilidad en comparación con la PCR. Además, requiere grandes cantidades de DNA celular y mayor gasto, lo que la hace inadecuada para el uso clínico de rutina. Esta técnica es útil para confirmar algunos casos de la PCR y para clasificar nuevos tipos virales identificados ^{5,7,32}.

La PCR es una técnica que ofrece varias ventajas sobre otros métodos, principalmente su capacidad de detección de cantidades muy pequeñas de DNA. Esta técnica, además de que requiere solo una pequeña cantidad de material biológico, puede detectar la presencia viral en etapas muy tempranas de la infección. Es altamente sensitiva y específica, y puede complementar la detección de manifestaciones clínicas del virus asociadas a lesiones orales. Por ello, la PCR es el método de detección viral más utilizado. Sin embargo, se considera una desventaja el riesgo de contaminación que podría originar falsos positivos ^{7,32}. Solo hay un caso en el que la ISH se puede considerar un método más sensible que la PCR, y es en aquellas muestras en las que tenemos pocas células infectadas por HPV pero con un alto número de copias del virus en las mismas, de modo que no son detectadas por la PCR ^{34,43}. Por otro lado, la PCR también puede dar lugar a falsos positivos debido a su alta sensibilidad a los genomas del HPV que pueden estar presentes en los tejidos orales, pero que no están relacionados con el cáncer ⁵. Existen algunos estudios que han usado métodos de PCR sensibles y han identificado DNA de HPV en una alta proporción (35-55%) de los carcinomas de células escamosas orales. Pero estas tasas de detección disminuyen en los estudios que requieren evidencia de la actividad oncológica del HPV. Sin embargo, si se usa como medida real de la presencia de virus oncológicamente activo la expresión de E6 y E7, el HPV se detecta en una pequeña fracción (1-5%) de carcinomas de células escamosas orales ⁴¹.

Por otro lado, hay estudios en los que se demuestra que la detección de la proteína p16 mediante técnicas inmunohistoquímicas se puede considerar una alternativa práctica para la detección de HPV, basándose en la alta correlación entre la detección de HPV y la sobreexpresión de p16 ^{5,41,44}. Esta técnica es rápida, barata y de fácil disponibilidad, por lo que se ha convertido en una técnica estándar para la evaluación clínica del estado del HPV ⁴⁵. Cabe señalar que no todos los tumores p16 positivos son HPV positivos. Así, aproximadamente el 10-20% de los carcinomas p16 positivos no muestran evidencia de infección por HPV ⁵. En cualquier caso, el estado de p16 positivo, incluso en ausencia de HPV positivo, tiene un significado pronóstico. Aunque la causa de la sobreexpresión de p16 no esté clara, puede haber otras causas como una infección viral alternativa, mutaciones inducidas por carcinógenos que conducen a la sobreexpresión de p16 u otra etiología ⁵.

En cuanto al serotipo buscado, se sabe que los serotipos de alto riesgo 16 y 18 son los más comunes (más el tipo 16) ^{5,18,33,34}. Se detectan en el 30% de las muestras de carcinoma de células escamosas oral ¹⁸. Desafortunadamente, la razón del tropismo específico de estos serotipos sigue sin estar clara ⁵. Solo en menos de un 1% de las muestras de carcinoma se ha detectado otro serotipo de alto riesgo distinto ¹⁸. De todas formas, la identificación del tipo específico de HPV actualmente no juega un papel clínico importante, debido tanto a la alta incidencia de HPV-16 como a la falta de conocimiento sobre cómo utilizar esta información si se obtuviera de forma rutinaria ⁵. En nuestro estudio, además de la búsqueda de los serotipos 16 y 18, hemos añadido la búsqueda de los serotipos benignos 6 y 11.

Debido a la gran controversia de resultados presentes en la literatura, hay estudios en los que se han tenido en cuenta otros factores, como pueden ser distintas localizaciones geográficas, edad y sexo de la población estudiada, grado histológico de la lesión e incluso el año de la publicación, no encontrando en ninguno de los casos diferencias significativas ¹⁸. Sin embargo, en dos estudios realizados en Estados Unidos se observó cómo el hombre tiene 2-3 veces mayor riesgo de tener infección oral por HPV que la mujer. Además, la prevalencia en la población muestra una distribución bimodal en cuanto a la

edad, con dos picos, uno más grande en torno a los 55-64 años, y otro más pequeño en torno a los 30-34 años ^{33,46}.

Numerosos informes clínicos proporcionan pruebas convincentes de que aquellos pacientes con HPV positivo tienen mejores resultados que aquellos que tienen HPV negativo, resultado que se extiende por varios continentes y métodos de tratamiento ⁵. La base biológica verdadera para esta mejora no está clara. Se ha postulado que el aumento de la sensibilidad a la radiación puede ser la causa en gran parte de la diferencia observada, y los datos preclínicos recientes proporcionan apoyo a esta hipótesis ^{47,48}. De todas formas, no se puede descartar factores biológicos alternativos, como puede ser una mejora de la vigilancia inmune en los carcinomas HPV positivos ⁵. Los estudios apoyan la hipótesis de que aquellos pacientes con carcinomas HPV positivos tienen significativamente mejor supervivencia (60-80% menos mortalidad), mejor control local/regional e incluso una pequeña mejora en la tasa de metástasis que aquellos con HPV negativo ^{5,49}. O'sullivan et al. ⁵⁰, en un estudio que realizaron a 500 pacientes, encontraron que estadios avanzados T o N eran predictores de recidivas metastásicas a distancia, independientemente de ser carcinomas HPV positivos o negativos. Esto implica que puede haber un límite a la favorabilidad biológica conferida por el hecho de ser HPV positivo ⁵⁰.

En resumen, para confirmar el papel de HPV como agente etiológico en el carcinoma de células escamosas oral, se requiere una evidencia adicional que se resume en los "Postulados modificados de Koch's" ⁵¹:

1. La infección viral precede al desarrollo del cáncer; de lo cual, aunque existe evidencia, no se ha confirmado formalmente ^{34,51}.
2. El genoma viral se encuentra presente en las lesiones tumorales o células tumorales; un hallazgo que sí está confirmado ^{34,51}.
3. Existe una asociación epidemiológica entre la presencia del virus y el desarrollo del cáncer; algo que, a día de hoy, no se ha demostrado ^{34,51}.
4. Las proteínas virales tienen la capacidad de transformar células in vitro; hecho que sí está claramente demostrado ^{34,51}.

5. Las proteínas virales tienen la capacidad de promover la formación de tumores en animales; lo cual está demostrado por un modelo experimental de ratón, donde existe la expresión de las proteínas E6 y E7 junto con otros carcinógenos que inducen la aparición de cáncer oral en 9 meses^{34,51-53}.
6. La vacunación profiláctica contra el HPV eliminará el carcinoma de células escamosas oral, lo cual requerirá al menos 20 años antes de que la prevalencia de cáncer oral en HPV vacunados y no vacunados se pueda determinar epidemiológicamente ^{34,51}.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Podría ser que el HPV, más que como factor etiológico en sí, interactúe con otros desencadenantes de la carcinogénesis, aumentando así el riesgo personal de sufrir un carcinoma oral.
2. Es importante tener en cuenta los datos de la historia clínica del paciente, como son el consumo de tabaco y alcohol, las costumbres sexuales, la edad, o cualquier otro factor de riesgo potencial que pueda llevarnos a confusión en futuros estudios.
3. Se debería ampliar la búsqueda de serotipos de HPV, ya que podrían revelarse otros HPV relacionados con el carcinoma de células escamosas oral.
4. También se puede considerar el hecho de que la coinfección por varios virus oncogénicos podría ser un importante factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma de células escamosas oral.
5. Para futuros estudios, es conveniente que se normalicen la toma de muestras, el procesamiento de éstas y los métodos de detección del virus, para permitir una comparación más precisa de los resultados de los distintos estudios.
6. Las infecciones orales de HPV necesitan ser estudiadas en profundidad, de manera que se puedan organizar programas de prevención de cáncer oral, incluyendo la posibilidad de vacunación contra HPV.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Del Barco E, Rodríguez Sánchez CA, Fonseca E, Cruz JJ. Carcinoma de cabeza y cuello. En: González Barón M (ed.). *Oncología Clínica* vol. 2. 3ª ed. Madrid: Momento Médico Iberoamericana; 2010. p25-60.
2. O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ et al. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012;48:1191-1201.
3. Gondivkar SM, Parikh RV, Gadbail AR et al. Involvement of viral factors with head and neck cancers. *Oral Oncol.* 2012;48:195-199.
4. Cortés-Funes H, Colomer-Bosch R. Cáncer de cabeza y cuello: generalidades. En: Cortés-Funes H (ed.). *Tratado de oncología* tomo 2. Barcelona: Permanyer; 2009. p156-167.
5. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL et al. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88:761-770.
6. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo CM et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:633-641.
7. Sand L, Jalouli J. Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect.* 2014;16:371-378.
8. Murugan AK, Munirajan AK, Tsuchida N. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years. *Oral Oncol.* 2012;48:383-392.
9. Saman DM. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. *Head Neck Oncol.* 2012;4:1:1-7.

10. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15:388-399.
11. Radoi L, Luce D. A review of risk factors for oral cavity cancer: the importance of a standardized case definition. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41:97-91.
12. Al-Swiahb JN, Chen CH, Chuang HC et al. Clinical, pathological and molecular determinants in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Future Oncol.* 2010;6:837-850.
13. Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol.* 2010;46:411-413.
14. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16:e306-e311.
15. Berthiller J, Lee YC, Boffetta P et al. Marijuana smoking and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1544-1551.
16. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:1974-1981.
17. da Silva SD, Ferlito A, Takes RP et al. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol.* 2011;47:783-791.
18. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011;47:1048-1054.

19. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12:1091-1094.
20. Dasanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Mate drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2010;46:82-86.
21. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology: clinical pathologic correlations. 6^a ed. St. Louis, MS: Elsevier Saunders; 2012.
22. Bagán JV. Medicina Bucal. 4^a ed. Valencia: Medicina Oral; 2011.
23. Monteiro LS, niz-Freitas M, Garcia-Caballero T et al. Combined cytoplasmic and membranous EGFR and p53 overexpression is a poor prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012;41:559-567.
24. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry.* 2011;50:5566-5582.
25. Sartor M, Steingrimsdottir H, Elamin F et al. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1999;80:79-86.
26. Rabinowits G, Haddad RI. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncol.* 2012;48:1085-1089.
27. Patel R, Leung HY. Targeting the EGFR-family for therapy: biological challenges and clinical perspective. *Curr Pharm Des.* 2012;18:2672-2679.

28. Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12 Suppl 1:S17-S27.
29. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:1566-1584.
30. Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*. 2011;55:685-696.
31. Mishra R. Cell cycle-regulatory cyclins and their deregulation in oral cancer. *Oral Oncol*. 2013;49:475-481.
32. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther*. 2011;7:120-127.
33. Sanders AE, Slade GD, Patton LL. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Dis*. 2012;18:430-441.
34. Syrjanen S, Lodi G, von B, I et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*. 2011;17 Suppl 1:58-72.
35. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Papilomavirus y poliomavirus. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds.). *Microbiología médica*. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2009. p.499-507.
36. Ramella MR, González MI, San Juan N. Infecciones virales. En: Negroni M (ed.). *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2009. p.419-448.
37. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*. 2001;20:7866-7873.

38. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12:418-424.
39. Cox MF, Scully C, Maitland N. Viruses in the aetiology of oral carcinoma? Examination of the evidence. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1991;29:381-387.
40. Termine N, Giovannelli L, Rodolico V et al. Biopsy vs. brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2012;48:870-875.
41. Poling JS, Ma XJ, Bui S et al. Human papillomavirus (HPV) status of non-tobacco related squamous cell carcinomas of the lateral tongue. *Oral Oncol.* 2014;50:306-310.
42. Termine N, Panzarella V, Falaschini S et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008;19:1681-1690.
43. Syrjanen SM. Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infection. Review article. *APMIS.* 1990;98:95-110.
44. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck.* 2012;34:459-461.
45. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared

- with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol.* 2010;21:1961-1966.
46. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307:693-703.
47. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73:4791-4800.
48. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ et al. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol.* 2013;107:242-246.
49. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV et al. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer.* 2014 (en prensa). doi: 10.1002/ijc.28876.
50. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol.* 2013;31:543-550.
51. Haverkos HW. Viruses, chemicals and co-carcinogenesis. *Oncogene.* 2004;23:6492-6499.
52. Jabbar S, Strati K, Shin MK et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology.* 2010;407:60-67.
53. Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14152-14157.