

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN
MUCOSA ORAL SANA, LESIONES VERRUGOSOPAPILARES, LEUCOPLASIA
Y CÁNCER ESCAMOCELULAR**

DOLLY ARISTIZÁBAL GARCÍA, Od. BSc

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
SANTIAGO DE CALI
2016**

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN
MUCOSA ORAL SANA, LESIONES VERRUGOSOPAPILARES, LEUCOPLASIA
Y CÁNCER ESCAMOCELULAR**

DOLLY ARISTIZÁBAL GARCÍA

**Trabajo de investigación para optar el título de
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Directora del Trabajo de Investigación
LIDA INES MANCILLA ESTACIO, MSc, PhD**

**Codirector del trabajo de investigación
ADALBERTO SANCHEZ, PhD**

**Asesora del trabajo de investigación
MERCEDES FIGUEROA MACCA, MSC, PhD (c)**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2016**

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de grado titulado: " DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA ORAL SANA, LESIONES VERRUGOSOPAPILARES, LEUCOPLASIA Y CÁNCER ESCAMOCELULAR presentado por la estudiante DOLLY ARISTIZÁBAL GARCÍA, para optar título de Maestría en Ciencias Biomédicas, fue revisado por el jurado y calificado como: Aprobado

Lida Mancilla Estacio, MSc, PhD
Director de Trabajo de investigación

Dr. Adalberto Sánchez, PhD
Co-Director de Trabajo de investigación

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Fecha: Santiago de Cali, Julio de 2016

DEDICATORIA

A mi Gran Ser Superior, ese Dios que habita en mí, doy gracias por fortalecer mi espíritu a través de este logro.

A mi Hija, por el tiempo no compartido

A mi Madre por sus oraciones

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al comité de postgrado de la Escuela de Ciencias Básicas Médicas, de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, por concederme el ingreso al programa académico de postgrados en Ciencias Biomédicas, especialmente a la Dra. Liliana Salazar, quién me aceptó en el grupo de investigación TEBLAMI, sus exigencias y enseñanzas fundamentaron el quehacer investigativo.

A la Universidad Santiago de Cali por su apoyo permanente y colaboración financiera.

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la culminación de éste proyecto principalmente a la Dra. Lida I. Mancilla Estacio, quien por su confianza, paciencia, experiencia y persistencia dirigió este trabajo de investigación. Con ella aprendí academia, el valor de la perseverancia, la fortaleza y la capacidad de superación.

A los auxiliares de la Universidad Santiago de Cali, por su colaboración y compromiso en mis comienzos de práctica de laboratorio: Sr. Uthey Vargas, Oscar García, Edwin Girón, Valeria Parra.

A las colaboradoras del Laboratorio de Histología, quienes reforzaron mi conocimiento, manejo y responsabilidades del entorno, Nhora Holguín, Martha Lucía Ceballos

A la Dra. Carolina Pustovrh por sus enseñanzas, aceptación y confianza en mí proceder como maestrante.

Al grupo de Patología del Hospital Evaristo García; su aporte fue fundamental y enriquecedor Dres: Andrés Agudelo, José Bravo y Armando Cortés.

10

A la Dra. Nhora Ayala, guía y gestora desde antes de iniciar éste mi gran proyecto.

Al Dr. Carlos Emiro Tasamá por el aporte de sus casos.

A mi familia en especial a mi hermana Lucy por ser mi soporte.

A la bacterióloga Mercedes Figueroa por su colaboración.

CONTENIDO

	Pág.
RESÚMEN	19
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1. CÁNCER ORAL.....	24
1.1.1 Clasificación Histológica.	24
1.1.1.1 Adenocarcinomas	24
1.1.1.2. Carcinoma Basocelular	24
1.1.1.3. Carcinoma de Células Escamosas o Epidermoide	24
1.1.1.4 Ubicación topográfica del cáncer oral.....	25
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	26
1.3. FACTORES DE RIESGO.	28
1.4. CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL	30
1.4.1. Características generales del Carcinoma Escamocelular.....	31
1.4.2. Características clínicas.....	32
1.4.3 Diagnóstico del Carcinoma Escamocelular Oral y de Orofaringe.	33
1.4.4 Tratamiento para los Carcinomas Escamocelulares.....	33
1.5. LESIONES BLANCAS PRECURSORAS DE CÁNCER.	34
1.5.1 Leucoplasia con displasia epitelial.....	36
1.5.2 Liquen plano	37
1.6 LESIONES BENIGNAS VERRUGOSOPAPILARES.	38
1.7 HIPERPLASIA EPITELIAL	38
1.7.1 Hiperplasia pseudoepiteliomatosa	38
1.7.2 Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck.....	39
1.7.3. Papiloma (Papiloma escamoso o Papiloma Plano).	40
1.7.4 Verruga común o vulgar o verruga infectiva	41

1.7.5 Condiloma Acuminado.....	42
1.8 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	47
1.8.1. Estructura del Virus del papiloma humano	47
1.8.2. Mecanismos de patogénesis y oncogénesis.	49
1.8.3. Diagnóstico de la infección por VPH.....	53
1.8.3.1 La pruebas de sospecha de infección viral.....	53
1.8.3.2 Pruebas de detección viral	54
2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA.....	57
3. JUSTIFICACIÓN.....	58
4. OBJETIVOS.....	60
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	60
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
5.1 TIPO DE ESTUDIO	61
5.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	61
5.3. POBLACIÓN DEL ESTUDIO.....	61
5.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	62
5.4.1 Criterios de Inclusión y exclusión.....	62
5.5 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.	63
5.5.1 Muestra en pacientes con mucosa oral normal	63
5.5.2 Muestra de tejido parafinado.	64
5.6 ESTUDIO HISTOPATÓLOGICO	65
5.6.1 Descripción del material parafinado.....	65
5.6.2. Confirmación del diagnóstico histopatológico	65
5.6.3. Caracterización histopatológica de lesiones Verrugosopapilares	66
5.7 DETERMINACION DEL ADN DEL VPH DE LAS MUESTRAS	67

5.7.1. Extracción de ADN de las muestras de hisopado mucosa oral sana.....	67
5.7.2 Extracción de ADN de biopsias	68
5.7.2.1 Cortes de tejido de las biopsias parafinadas	68
5.7.2.2 Desparafinación de las biopsias de cavidad bucal	68
5.7.2.3 Extracción de ADN de tejido desparafinado	69
5.7.3 Determinación de la calidad y cantidad del ADN extraído por la amplificación del Gen β -globina humano.....	70
5.7.4 Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) para amplificación de β - globina.	71
5.7.5. Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) para amplificación del gen E7 de VPH-16.....	72
5.7.6 Control positivo.....	73
5.8 ANÁLISIS ESTADISTICO.....	74
5.8.1. Elaboración de la base de datos.....	74
5.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	75
6. RESULTADOS.....	76
6.1 CARACTERIZACION DE LA POBLACION DE ESTUDIO	76
6.1.1 Factores sociodemográficos en participantes con mucosa sana.....	76
6.1.2 Caracterización patológica y sociodemográfica de las lesiones orales. ..	78
6.1.3 Distribución de las lesiones orales según diagnóstico y topografía.	78
6.1.4 Distribución topográfica de acuerdo al tipo de lesión. e presentó en el reborde alveolar superior 3 de 4 lesiones (75.0%).	80
6.2 EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN	81
6.3 FRECUENCIA DE VPH16 E7 EN MUESTRAS ORALES	84
6.3.1 Frecuencia de VPH16 E7 en muestras de mucosa oral sana	84
6.3.2 Factores sociodemográficos de población VPH positivos de mucosa oral sana	86
6.3.3 Factores de comportamiento social y sexual asociados a la Infección por VPH16 en participantes con mucosa sana.....	88

6.4 FRECUENCIA DE VPH16E7 EN BIOPSIAS DE LESIONES ORALES.....	90
6.4.1. Distribución de las lesiones orales con resultados β -globina según topografía oral	90
6.4.2. Características demográficas de género y edad en lesiones orales con presencia de ADN de VPH 16.	91
6.4.3 Caracterización histopatológica del grupo de lesiones orales VPH16E7 positivas.....	92
6.4.4. Caracterización según diagnóstico y topografía con presencia de VPH 16.	94
6.5 CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LAS LESIONES VERRUGOSOPAPILARES	96
6.5.1 Caracterización histopatológica de las lesiones verrugosopapilares con presencia de VPH16E7.	98
6.6. REGISTRO HISTOPATOLÓGICO DE LESIONES CON MUESTRA CLÍNICA	100
7. DISCUSION	104
7.1. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR VPH EN MUCOSA ORAL	104
7.2. PORCENTAJE DE MUESTRAS DE ADECUADA CALIDAD DE ADN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE VPH16	110
7.2.1 Determinación del GEN E7 de VPH 16 Mediante PCR	110
7.3. PRESENCIA DE VPH16 EN LESIONES BENIGNAS Y PRECURSORAS DE CÁNCER	112
7.4. PRESENCIA DE VPH EN CÁNCER.....	114
7.5. DISTRIBUCIÓN TOPOGRÁFICA DE LESIONES CON DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE VPH	115
7.6. CORRELACIÓN DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO SUGESTIVO DE VPH CON EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	117

8. CONCLUSIONES	119
9. PROSPECTIVAS	120
BIBLIOGRAFIA	1202

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Criterios de la OMS para clasificación de las lesiones precursoras de cáncer oral	35
Tabla 2. Prevalencia de VPH en lesiones premalignas de cabeza y cuello	37
Tabla 3. Relación del virus VPH+ en lesiones verrugosopapilares	44
Tabla 4. Criterios de Toki (Fuente: <i>Toki T, Yajima/1987</i>).....	45
Tabla 5. Infección por VPH en mucosa normal.....	47
Tabla 6. Descripción de muestras de cavidad oral del estudio. N= 268	62
Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos cebadores y tamaño de los productos amplificados, utilizados en la amplificación del gen <i>β-globina</i>	70
Tabla 8. Protocolo de amplificación del gen <i>β-globina</i> PC04-GH20 y PC04- PC03 para muestras de Mucosa oral y Biopsias orales.....	71
Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos cebadores y tamaño de los productos amplificados, utilizados en la amplificación del gen <i>E7</i> del VPH16.....	73
Tabla 10. Protocolo de amplificación del gen <i>E7</i> de VPH16 de muestras de mucosa oral sana y de biopsias orales.	73
Tabla 11. Caracterización demográfica y de los factores de riesgo de la infección de mucosa oral.....	77
Tabla 12. Características demográficas de las lesiones orales.	78
Tabla 13. Distribución de las lesiones orales según diagnóstico y	79
Tabla 14. Distribución topográfica de las lesiones orales.	80
Tabla 15. Relación de resultados generales de extracción de ADN, muestras con <i>β-globina</i> positivas y muestras VPH positivos, de hisopado de mucosa oral y biopsia de lesiones orales.....	84
Tabla 16. Factores sociodemográficos de población VPH positivos de Mucosa oral.....	87

Tabla 17. Factores de riesgo del estilo de vida para la infección en Mucosa oral sana.....	88
Tabla 18. Factores de riesgo del comportamiento sexual para la infección por VPH.....	89
Tabla 19. Distribución de las lesiones orales con resultados <i>β-globina</i> según topografía oral.....	91
Tabla 20. Características demográficas género y edad con resultado de VPH ...	92
Tabla 21. Frecuencia de VPH16 en Mucosa Oral.....	93
Tabla 22. Caracterización según diagnóstico y topografía con resultado de VPH95	
Tabla 23. Caracterización histopatológica de las Lesiones Verrugosopapilares...	97
Tabla 24. Comportamiento de la caracterización histopatológica de las lesiones Verrugosopapilares VPH Positivos	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Topografía de la cavidad oral.	26
Figura 2. Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck	39
Figura 3. Características histopatológicas de la hiperplasia epitelial focal	40
Figura 4. Papiloma escamoso Figura 5. Verruga común	41
Figura 6. Características histopatológicas del Papiloma escamoso	42
Figura 7. Condiloma Acuminado	43
Figura 8. Papel de los genes que conforman el Genoma del VPH	48
Figura 9. Esquema Genómico del virus del Papiloma Humano	49
Figura 10. Estructura de la cápside viral	49
Figura 11. Mecanismo del VPH asociado a Carcinogénesis Oral	51
Figura 12. Toma de muestras de mucosa oral	64
Figura 13. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de <i>β-globina</i> . Carril N control Negativo Carril 2 a 10 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 12 control positivo (linfocitos), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder. Thermofisher)	82
Figura 14. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 110 pb del gen de <i>β-globina</i> . Carril N control Negativo, Carril 2 a 10 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 11 y 12 control positivos (linfocitos), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder. Thermofisher)	82
Figura 15. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 110 pb del gen de <i>β-globina</i> . Control Negativo (N), Carril 1, 2,6-9,10-17 amplicones obtenidos a partir de biopsias oral, carril 11 y 18 controles positivos (linfocitos), MP con peso molecular 100 pb	

	(DNA Ladder. Thermofisher). El control Negativo (N), ADN de biopsias orales desde el carril 1 al 8.	83
Figura 16.	Amplificación representativa de productos obtenidos por <i>PCR</i> de un fragmento de 277 pb del gen de <i>E7 VPH16</i> . Carril N control Negativo Carril 2 ,4, 5, 7, 9 muestras amplificadas de mucosa oral, carril 12 control positivos (DNA Caski), carril 13 patrón de peso molecular (ADN Ladder.Thermofisher). Agarosa al 2%.....	85
Figura 17.	Amplificación representativa de productos obtenidos por <i>PCR</i> de un fragmento de 96 pb del gen de <i>VPHE7</i> . Carril N control Negativo, Carril 2 ,4 ,5, 7, 9 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 12 control positivos (DNA Caski), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder.Thermofisher)......	85
Figura 18.	Amplificados de <i>E7</i> de <i>VPH 16</i> a partir de biopsias Orales: obsérvese amplicones con marcador de peso de 96 pb. (MPM). CK: control positivo Caski N o (-): Control Negativo CD= Condiloma HSE: Hiperplasia Seudoepiteliomatosa PE= Papiloma Escamoso CAE: carcinoma Escamocelular HE: Hiperplasia epitelial.	90
Figura 19.	Papiloma Escamoso	101
Figura 20.	Condiloma Acuminado.....	102
Figura 21.	Leucoplasia verrugosa proliferativa.	103

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 POE 001 Toma de muestra de mucosa oral
- Anexo 2 POE 002 Extracción ADN
- Anexo 3 POE 003 Desparafinación
- Anexo 4 POE 004 Electroforesis en gel de Agarosa
- Anexo 5 Certificado Comité de Ética Universidad del Valle.
- Anexo 6 Certificado Comité de Ética universidad del HUV
- Anexo 7 Certificado Comité de Ética universidad del HUV
- Anexo 8 Certificado Comité de Ética Universidad Santiago de Cali.
- Anexo 9 Certificado de Idoneidad del manejo de bloques parafinados
Doctor Tasamá
- Anexo 10 Consentimiento informado pacientes toma hisopados mucosa oral
- Anexo 11 Instrumento de medida (encuesta)
- Anexo 12 Acta de Aprobación.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Acido desoxirribonucleico
CEC:	Carcinoma Escamocelular oral
CECCC:	Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello
CO:	Cáncer Oral
CUP:	Clasificación única de procedimiento
dNTP:	De la sigla en inglés: Deoxyribonucleotide triphosphate
IARC:	Agencia Internacional para la investigación de cáncer
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	MiliMolar
OMS:	Organización mundial de la salud
pb	Pares de bases
PCR:	De la sigla en inglés: polymerase chain reaction
pmol	Picomoles
POE:	Procedimiento operativo estandarizado
pRB:	Proteína retinoblastoma
Tris-HCL:	De la sigla en inglés: TRIS hydrochloride
uL	Microlitro
VADS:	Vías aéreo digestivas superiores
VPH:	Virus del papiloma humano
VPH-AR:	Virus del papiloma humano de alto riesgo

RESÚMEN

El cáncer en cavidad bucal es una problemática de carácter mundial, ocupando el octavo lugar entre todas las muertes por cáncer. El 90% de este tipo de cáncer tiene diagnóstico de Carcinoma Escamocelular (CEC). el consumo excesivo de alcohol y uso de tabaco están establecidos como los factores de riesgo más importantes de cáncer de cavidad bucal, una pequeña proporción de los casos CEC de cabeza y cuello, se presentan en pacientes que no han estado expuestos a estos factores de riesgo. La presencia de un factor viral, particularmente Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), frecuentemente el tipo 16, ha sido implicada, en un 20 a 30% de casos de esta malignidad. Esta infección viral también ha sido reportada en mucosa normal, en un rango entre 40 y 80%, en lesiones precursoras de cáncer que incluyen las hiperqueratosis, las leucoplasias, las displasias en un 15% y 20% y en lesiones clínicas de carácter benigno (verrugasopapilares) como el Papiloma Escamoso, la Verruga común, la Hiperplasia Epitelial y Condiloma Acuminado en un 6% a 10%. Este estudio tuvo como fin, la detección el gen E7 de VPH - 16 en cavidad oral, en 69 hisopados de mucosa oral sana, en 198 biopsias parafinadas, con diagnóstico de lesiones verrugasopapilares, lesiones precursoras de Cáncer y Carcinoma Escamocelular del suroccidente de Cali. Se determinó la presencia de VPH 16 mediante la amplificación, de un fragmento del gen viral E7, empleando la técnica de PCR. Se realizaron caracterizaciones histopatológicas de las lesiones verrugasopapilares VPH+ orales. Se obtuvo una presencia de 22.44% de VPH en cavidad oral (35/155). En mucosa oral sana la frecuencia de VPH fue de 44% (22/49) y en lesiones de cavidad oral la frecuencia viral fue de 12.24% (13/106): Papiloma 5.66% (6/106), Condilomas 1,88% (2/106), Hiperplasias 2.83% (3/106), Lliquen Plano 1%(1/106), Carcinoma Escamocelular 1%(1/106)

Con mucosa sana el factor más asociado a posibilidad de infección fue la práctica de sexo oral en población joven ($p=0.01$) De las lesiones estudiadas las más frecuentes en boca son las hiperplasias y los sitios que más se afectan son paladar, lengua, carrillo. Los hallazgos estructurales predominantes son coilocitos entre la capa espinosa y basal (75%); con núcleo delgado y granuloso, con vacuolización en citoplasma (50%), la queratina se presenta en la mayoría de los casos. y presencia de células mitosoidales (37.5%); Por tanto en este estudio, la presencia de VPH16 por PCR se detectó en mucosa sana, lesiones benignas, premalignas y células tumorales. Factores de comportamiento sexual como el sexo oral, pueden incrementar la infección. La presencia de lesiones en cavidad oral con VPH16, pueden generar riesgo de transformación maligna. Lesiones benignas ameritan estudios complementarios con más subtipos oncogénicos de VPH. Es importante generar campañas de promoción y prevención.

Palabras claves: Virus del papiloma humano, mucosa oral sana, lesiones verrugosopapilares, leucoplasia, cancer, PCR

INTRODUCCIÓN

El cáncer en cavidad bucal se establece como una problemática de carácter mundial, ocupando el octavo lugar entre todas las muertes por cáncer. El 90% de diagnósticos corresponden al tipo histológico de Carcinoma Escamocelular (CEC)(1). En Colombia Entre 2007 y 2011 se encontró una prevalencia de 2.200 casos para hombres y para mujeres de 1.804 casos según el Instituto Nacional de Cancerología (2015) (2). El consumo excesivo de alcohol y uso del cigarrillo están completamente establecidos como los factores de riesgo más importantes en cavidad oral; además de las deficiencias de micronutrientes, pobre higiene oral y otros agentes infecciosos como Epstein Barr y factor genético familiar. (3) se considera que su incidencia mostrará un elevado incremento, a menos que se controlen estos factores. Una pequeña proporción de los casos CEC de cabeza y cuello, se desarrollan en pacientes que no han estado expuestos a estos riesgos. La presencia de un factor viral, particularmente el Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), ha sido implicada, con una prevalencia de un 20% a un 30%, principalmente el subtipo 16 (4).

Los avances en técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR) ha permitido detectar con mucha precisión, la presencia de muchos tipos de VPH denominados de bajo y alto riesgo (por su frecuencia en tumores) en especial el 16 y el 18 (5). La presencia de VPH16 también ha sido reportada en mucosa normal, en un rango entre 0 y 80%, Mancilla y Col 2012 (6), la presencia de VPH fue determinada a partir de ADN del epitelio bucal de 48 personas sin lesiones orales, empleando la técnica de PCR. El gen E7 de VPH tipo 16 fue amplificado en 21 de 48 (43.8%), en una población sana de la ciudad de Cali.

Con relación a lesiones precursoras de cáncer, que incluyen hiperqueratosis, leucoplasia y displasia, se ha encontrado presencia viral de alto riesgo entre un 15% y 20%. y empleando diversas *PCR*, hibridación in situ, *PCR* anidada entre otras, se ha podido detectar, en lesiones clínicas de carácter benigno (verrugoso papilares), como el Papiloma Escamoso, la Verruga Común, la Hiperplasia Epitelial y Condiloma Acuminado en un 6% a 10%. En Colombia Ortiz A. y col 2011 (7), encontraron en un estudio en biopsias parafinadas de lesiones benignas procedente de pacientes de la ciudad de Cali, la presencia de *VPH-16 (gen E7)* en 8 de 19 (42.1%) casos

El uso de técnicas moleculares en la detección de la presencia viral, permite aportar evidencias del rol etiológico del VPH en lesiones precursoras de cáncer y en uno de los subgrupos de cáncer oral. Esto sugiere la importancia de la identificación temprana de las manifestaciones bucales de VPH y de un tratamiento oportuno, como elementos claves en programas para la reducción de la morbilidad y mortalidad por cáncer bucal.

El propósito de este estudio estuvo encaminado, a determinar la presencia del gen E7 de VPH16, por la técnica de *PCR*, en una población colombiana. Se realizaron hisopados en 70 participantes voluntarios, en mucosa oral sana. Se determinó la asociación de cofactores sociodemográficos, de comportamiento social y sexual, además se detectó la presencia viral en 198 muestras de biopsias en bloques parafinados, con diagnóstico de Papiloma, Condiloma, Hiperqueratosis; en un grupo de hiperplasias epiteliales, incluyendo, hiperplasias con hiperqueratosis, pseudoepiteliomasas, displasias leves y moderadas, liquen plano y con diagnóstico de Carcinoma Escamocelular. Se realizó una caracterización histopatológica de lesiones verrugosopapilares *VPH* positivo.

Teniendo en cuenta las escasas publicaciones en relación a este tema en Colombia y la región, este trabajo aporta al conocimiento de la etiopatogenia de la

presencia viral de alto riesgo (*VPH16*) y fortalece el manejo de la patología a nivel oral.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. CÁNCER ORAL

Se define Cáncer a un grupo de patologías que se caracterizan por una multiplicación anormal y desordenada de células, con crecimiento autónomo y capacidad de invadir otros tejidos. Su principal atributo es su capacidad de transformación, crecimiento ilimitado, infiltración y metástasis fuera del lugar de origen, que varía en función del Cáncer primario. Es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardíacas en los Estados Unidos como en el resto del mundo (*Globocan,2008*)(8). Es de etiología multifactorial, suele ser asintomática y generalmente desapercibida. Las neoplasias malignas, de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales del embrión, se denominan Carcinomas.

1.1.1 Clasificación Histológica. El cáncer se clasifica según características histológicas, en Adenocarcinomas y Carcinomas (9).

1.1.1.1 Adenocarcinomas: Se presentan alteraciones celulares del revestimiento interno de las glándulas de secreción externa.

1.1.1.2. Carcinoma Basocelular: Surge de las células basales, que se ubican en la capa más profunda del epitelio.

1.1.1.3. Carcinoma de Células Escamosas o Epidermoide: El Carcinoma de Células Escamosas es también denominado Carcinoma Epidermoide, Carcinoma Espino Celular y Escamo Celular, dependiendo de la capa epitelial afectada, así mismo deriva su nombre sea espinosa o escamosa (superficial) (10). Lesión que se inicia en las células escamosas, que revisten la mucosa de la cavidad oral, de

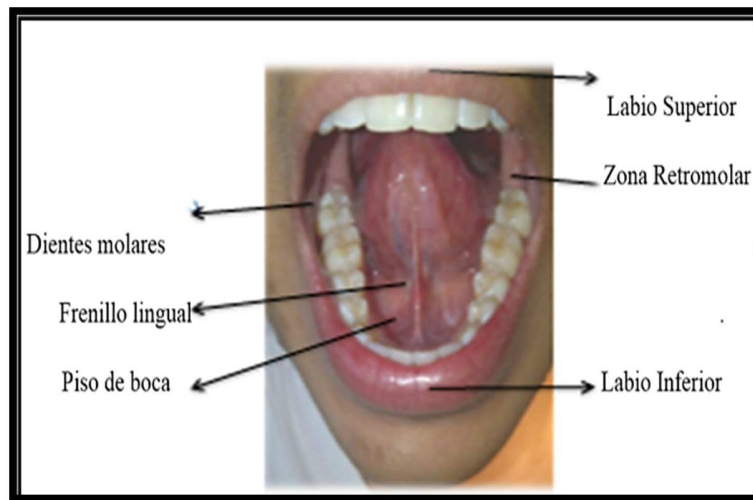
las vías respiratorias y digestivas superiores, uno de los cánceres más comunes de cabeza y cuello, representa aproximadamente el 96% de todas las neoplasias malignas de la cavidad bucal, y el 4% son Sarcomas. Aparece con más frecuencia a partir de la quinta década de la vida y constituye el 3% de los cánceres diagnosticados en hombres y el 2% en mujeres. La sobrevida a los 5 años es de 54%. El Carcinoma Escamocelular de cavidad oral está entre los 12 cánceres más comunes del mundo, ocupando el séptimo y octavo lugar en hombres y mujeres respectivamente. Se presenta marcada diferencia en incidencia y mortalidad entre países, grupos étnicos y regiones en el mismo país. La variación de la prevalencia se atribuye a una mayor frecuencia de sus factores de riesgo, como el uso de tabaco y el consumo excesivo de alcohol, además de la dieta y la susceptibilidad genética (11).

En cuanto al cáncer oral, por lo general es Carcinoma de Células Escamosas o Epidermoide, se presenta en áreas de leucoplasia (parches blancos de células que no desaparecen al frotarlos) que histopatológicamente pueden ir desde una hiperqueratosis, avanzar a una displasia leve, moderada y severa. O pueden presentar también parches rojos o áreas eritematosas (eritroplaquias) en sus estadios iniciales con variantes histológicas hasta la displasia severa, carcinoma in situ o invasivo hasta en un 90% de los casos(10)(12).

1.1.1.4 Ubicación topográfica del cáncer oral. Las lesiones por cáncer se manifiestan en el labio inferior (35%), bordes laterales y ventral de lengua (25%), suelo de la boca (20%), labio superior (escaso%), paladar blando 15%, encías/cresta alveolar 4-6% y mucosa bucal en 1%. La Cavidad oral presenta una topografía que permite la descripción de una área afectada; incluye los labios, el revestimiento interior de los labios y las mejillas (mucosa bucal), los dientes, las encías, las dos terceras partes anteriores de la lengua, el piso de la boca bajo de la lengua y el paladar duro. El área detrás de los últimos molares (llamada triángulo retromolar) puede ser incluida como parte de la cavidad oral, aunque con

frecuencia se le considera como parte de la orofaringe. La orofaringe es la parte de la garganta justo detrás de la boca que comienza donde termina la cavidad oral, incluye la base de la lengua (el tercio posterior de la lengua), el paladar blando, las amígdalas, así como las paredes laterales y posteriores de la garganta (13). Figura 1.

Figura 1. Topografía de la cavidad oral.



Fuente. Archivo Consultorio Dolly Aristizábal, BSc, 2012

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Según Globocan 2008 se detectaron 263.900 nuevos casos de cáncer en boca y orofaringe en hombres y 128.000 muertes en el año 2008. Con mayor prevalencia en Melanesia, Asia central, Europa central y oriental, en menor escala en Centroamérica y Asia oriental (8).

Para el año 2012 la incidencia mostró un incremento a 300.373 casos en el mundo y la mortalidad se elevó a 145.328 (1). La Sociedad Americana Contra El Cáncer registra 48,330 casos cáncer de orofaringe y de cavidad oral, con prevalencia en

proporción 2:1 más en hombres que en las mujeres(13). El cáncer oral es la octava causa de muerte por cáncer en el mundo. La tasa de incidencia y mortalidad varían geográficamente. La incidencia depende de los factores de riesgo más predisponentes el consumo de tabaco y alcohol.

El índice de mayor mortalidad en el cáncer de cabeza y cuello en orden es:

La cavidad oral con 389.000 casos/año

La laringe con 160.000 casos/año

La faringe con 65.000 casos/año

En los países más desarrollados, como Estados Unidos de América, la incidencia es de 1.6% para ambos géneros, la mortalidad registrada es 0,7%. Mientras en países en desarrollo como los de Sur América, la incidencia es de 2,0%, la tasa de mortalidad hasta 1,4%, (14). En Colombia con relación a todos los cáncer según localización la incidencia de CO (Cáncer oral) y de orofaringe en hombres fue de 787 casos/año, con una tasa de 3.5%; mortalidad de 295 muertes/año, una tasa de 1.5% y prevalencia de 2020 casos y en mujeres 707 casos/año, con una tasa de 3.1%; mortalidad de 206 muertes/año con una tasa de 0.9% y prevalencia de 1084 casos entre los años, entre 2007- 2011, datos reportados por el Instituto Nacional de cancerología (2). Para el departamento del Valle, la incidencia entre 2007 al 2011, reportada fué de 179 casos/año, una tasa de 4.0%; mortalidad de 58 casos/año con una tasa 1.3%. Y la prevalencia en cinco años de 452 casos.

En Cali según un análisis poblacional de la incidencia y tendencia de cáncer oral reportado por Ordoñez y col (2014), en un periodo comprendido entre 1962 y 2007; registró 1637 diagnósticos de cáncer oral, 1197 correspondieron a CEC, con una incidencia de 1.6% y una mortalidad de 1.2%, y hasta esa fecha con tendencia a la disminución, en el género masculino(15).

Actualmente el blanco de investigación es estudiar la relación etiológica entre la infección por VPH y el cáncer en cavidad oral como un factor de riesgo. La IARC (Agencia Internacional para la investigación de cáncer) realizó un estudio de asociación del VPH y cáncer oral con 1415 casos de cáncer de cavidad oral y 255 casos de cáncer de orofaringe, de un total de 1670 casos en 9 países. Otro estudio en 5046 muestras orofaríngeas en 26 países, registró que 23.5% estaban infectadas por VPH (16).

Similarmente México, a través del Instituto Nacional de Cancerología, detectaron en 42% de los casos de cáncer oral, presencia de VPH de alto riesgo genotipo 16; Suecia detectó el 40% de muestras de CEC en cavidad oral y orofaríngeo, tenían la infección por VPH (52/131) (17).

1.3. FACTORES DE RIESGO.

El carcinoma de cabeza y cuello es una enfermedad asociada a factores ambientales. El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo (75%).de muertes de Cáncer oral. (*Globocan 2012*) (1)(18).

El consumo de alcohol es otro factor de riesgo importante, también la falta de higiene oral, el sexo oral, masticar hojas de betel, nuez de areca, toombak, entre otros (19)(20).

Con relación al consumo de alcohol o exposición de la cavidad oral a prácticas pirotécnicas con alcohol, son un factor de riesgo a tener en cuenta, más aún si se suma el hábito de fumar. El efecto del etanol sobre la permeabilidad de la membrana, permite que los carcinógenos del tabaco penetren con mayor facilidad(21). El Acetaldehído, un derivado metabólico de la microflora bacteriana, tanto bucal como sistémica, se encuentra también como factor de riesgo

preponderante(20). Masticar betel, nuez de areca (efectos estimulantes), tabaco cal hidratada, y el consumo de alcohol están asociadas con lesiones premalignas como las formas de eritroplaquia y leucoplaquia (22)(23).

El efecto del tabaco en la prevalencia de CO, se ve reflejada en los estudios epidemiológicos, sobre todo en los países donde su uso es exagerado (Europa occidental y Estados Unidos, entre otros)(24). En cuanto al género y etnia, evidencias en Estados Unidos demuestran mayor susceptibilidad al CO en mujeres afrodescendientes y hombres blancos(25), sobre todo si tiene el hábito de fumar o tomar licor.

Una pequeña proporción (15%-20%) de los casos CO de cabeza y cuello, no han estado expuestos a estos riesgos, como una cohorte de hombres jóvenes con cáncer orofaríngeo, mujeres jóvenes con cáncer de lengua y mujeres mayores con cáncer gingival bucal, no asociados al consumo de alcohol y al uso de cigarrillo, incluyendo grupo de mujeres adultas mayores con CO sin factores de riesgo mencionado (Kruse et al. 2010) (4)

La asociación de VPH como factor de riesgo para CO, es una fuente de investigación en la actualidad, ante la confirmación de la asociación de VPH oncogénicos y cáncer de cérvix (99.7%) (18). Los estudios epidemiológicos y moleculares sugieren que VPH es un factor etiológico, en el desarrollo del Carcinoma Escamocelular de cabeza y cuello (CECC), especialmente en el área orofaríngea (26) (27).

La presencia de VPH de alto riesgo en el CO, es fuente de muchas controversias en el mundo. La prevalencia de la infección por VPH-16 asociada a CO, es alta (20-30%), principalmente en la lengua. Varios estudios reportan prevalencia desde 2.6% hasta 98% (28)

1.4. CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL

Como se había mencionado anteriormente la etiología del CO, es de carácter multifactorial, sobre todo se resalta el uso del tabaco principalmente de consumo de puro y pipa; en Colombia se resalta un hábito cultural relacionado con las mujeres fumadoras inversas de la zona pacífica en las que se ha considerado la probabilidad de presentar cinco veces más manifestaciones clínicas en forma de placas moteadas en paladar con transformación maligna, entre un 10% a un 18.2%. (29).

El alcohol, otro factor de riesgo se le atribuye una probabilidad mayor en un 20%, debido al efecto irritante en la mucosa y como solvente de carcinógenos.

Las infecciones por microorganismos están asociadas a cambios neoplásicos de carácter maligno.(10)(12) como:

La *Cándida albicans*: produce un cancerígeno como N - Nitrosobencil etilamina

El *Treponema pallidum*: causa úlceras crónicas y aumenta el riesgo de cáncer de lengua en pacientes con hábitos de fumar y consumo de licor en exceso.

El Virus *del Epstein Barr*. (VEB): asociado al linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo.

El Virus del Herpes simple- II (VHS)

El Virus del *Papiloma humano* (VPH)

Existen otros cofactores asociados a cáncer oral, como:

La deficiencia de hierro en el Síndrome de Plummer Vinson: enfermedad considerada como la única alteración nutricional convincentemente relacionada con Ca Oral, en el cual se desarrolla una atrofia de la mucosa gastrointestinal con aumento de susceptibilidad al Ca. de esófago.

Irritaciones locales por trauma: generalmente las causadas por prótesis, que generan erosiones clínicas y subclínicas.

Exposición continua de luz ultravioleta solar puede provocar queilitis actínica, caracterizada por lesión en labio con frecuencia en zona inferior, con transformación a un carcinoma in situ. Otros factores asociados se incluyen el humo del tabaco y la irritación crónica.(30)

1.4.1. Características generales del Carcinoma Escamocelular: Las formas más tempranas del cáncer son: la leucoplasia (placa blanca) y la eritroplasia (placa roja), que pueden ocasionar úlceras indoloras, masas tumorales o excrecencias verrugosas.

Histopatológicamente los carcinomas se clasifican en tres grados: Bien, moderado y mal diferenciados, Estas lesiones malignas o carcinomas se clasifican dependiendo:

De la similitud con la arquitectura normal

De la producción de queratina y de perlas de queratina

De la presencia o pérdida de cohesión celular

De la relación con la membrana basal: carcinoma *in situ* y carcinoma *invasivo*,

(10) (12)

Los carcinomas *invasivos*, rompen la membrana basal, profundizan al tejido conectivo y su infiltración provoca induración a los tejidos profundos, hasta la

imposibilidad de abrir la boca. El Carcinoma Escamocelular puede alcanzar vasos sanguíneos, favoreciendo la metástasis.

1.4.2. Características clínicas. Topográficas del Carcinoma Escamocelular oral (CEC). El carcinoma oral en labio: el 25 al 30 % de los CO, corresponde a esta zona, principalmente en hombres entre 50 a 70 años. Se manifiesta como lesiones ulceradas crónicas que no cicatrizan o como lesiones verrugosas, generalmente en los lados del labio inferior y pocas veces en la parte central. Son casi siempre asintomáticos. La metástasis se presenta más en ganglios linfáticos, gástricos y cervicales (13).

El Carcinoma Escamocelular de lengua corresponde del 25 al 40 % del CO, se presenta en las últimas décadas de la vida. Clínicamente inicia como una úlcera indurada que no cicatriza con bordes elevados. (en conformación de rollos de algodón). El crecimiento puede provocarse exofítica y endofíticamente. La ubicación más persistente es el borde lateral y base posterior de lengua. A veces la difícil visualización de las lesiones y la poca sintomatología en sus estadios iniciales, conllevan a un progreso de la lesión sin que se diagnostique a tiempo, mientras que en etapas de invasión profunda puede provocar disfagia.

La desviación de la lengua en movimientos de extrusión, es en la mayoría de las veces un signo indicativo de presencia de carcinoma. Las adenopatías en el cuello están relacionadas con metástasis de ésta área bucal.(31)

El Carcinoma Escamocelular de Piso de boca: se manifiesta entre un 15 a 20 %. Es el segundo CO más frecuente y predomina en hombres ancianos. Clínicamente se presenta como úlcera dolorosa no cicatrizada e indurada o puede aparecer en forma de placa roja o blanca. Las lesiones en esta zona pueden provocar disminución de la movilidad de la lengua. Los factores de riesgo más

predominantes son el uso del cigarrillo y el consumo de alcohol. La presencia de nódulos linfáticos mandibulares está relacionada con la metástasis de esta zona.

El Carcinoma Escamocelular de mucosa bucal y encía: Frecuencia del 10%. Se presenta como placas blancas, úlceras o lesiones exofítica. El carcinoma en encía: la lesión puede avanzar hacia el hueso y llevar a la movilidad o pérdida de dientes y si invade nervios puede expresarse en parestesia. El factor de riesgo más relacionado es el uso del tabaco masticable.

En la topografía palatina, el CEC, se desarrolla en un 10% a un 20 % de los casos de cáncer oral. Considerando la zona del paladar duro anterior menos frecuente que en zona posterior de la bóveda palatina. Se presenta inicialmente como leucoplaquias o como eritroplaquias.(10)

1.4.3 Diagnóstico del Carcinoma Escamocelular Oral y de Orofaringe.

Generalmente, dado su aspecto clínico puede presentar similitud con otras alteraciones; el adecuado manejo de las ayudas diagnósticas la utilidad de biopsias y el estudio histopatológico permiten acertar en un diagnóstico definitivo. Entre las lesiones diferenciales se encuentran la tuberculosis, la sífilis, las infecciones micóticas profundas y las úlceras traumáticas.

1.4.4 Tratamiento para los Carcinomas Escamocelulares. Los tratamientos contra cáncer oral requieren de un protocolo y dirección de personal altamente calificado, determinado para mejorar la calidad de vida del paciente; incluye intervención quirúrgica y radioterapia, la cual se define teniendo en cuenta la ubicación, extensión, profundización y diferenciación histológica.(32).

Existe la radioterapia profiláctica o la disección de nódulos del cuello con el fin de evitar lesiones metastásicas. La quimioterapia para células escamosas, no es efectiva porque se presenta resistencia. El pronóstico de este tipo de cáncer, es

multifactorial, debido a que depende del tipo histológico, la extensión de la lesión, edad de paciente, género, estado de salud inmunológico o mental.

El carcinoma *in situ* y el bien diferenciado permiten un tratamiento efectivo y preventivo, con una tasa de sobrevida mayor que el carcinoma histológicamente invasivo y mal diferenciado. La detección de VPH tempranamente permite evitar estadios avanzados mediante su manejo.

1.5. LESIONES BLANCAS PRECURSORAS DE CÁNCER.

La OMS (33), hace referencia a la Leucoplasia, como una lesión predominantemente blanquecina, localizada en la mucosa oral que no puede ser caracterizada como ninguna otra lesión definida ni desde el punto de vista clínico ni histológico, con imposibilidad de ser eliminada mediante el simple raspado, a diferencia de candidiasis pseudomembranosa (31). Alteración de las células por efectos genéticos, y externos presentan mayor predisposición a la cancerización. Es un estado reversible y no implica necesariamente neoplasia o transformación maligna. Lo que induce a considerar que un diagnóstico precoz y una terapéutica preventiva son consideraciones importantes a seguir como estrategia de salud. *Aguas et al* en 2004, se refieren a distintas lesiones blancas premalignas(34) como leucoplasias, líquenes atípicos, queratosis y la úlcera traumática crónica. Los factores predisponentes al desarrollo de estas lesiones incluyen: consumo de alcohol, el hábito de cigarrillo, masticar tabaco, fumar a la inversa(29), trauma. Al dejar el hábito de fumar estas lesiones desaparecer hasta en un 60%.

En general, clínicamente se presenta como una mancha o placa uniforme de color blanco, homogénea, en parche o moteada; se presenta en diversidad de tamaños, en cualquier zona de la cavidad oral, puede ser lisa o rugosa y puede presentar grietas o fisuras, en forma de “barro agrietado”, los colores varían de blanco hasta pardo-amarillentas por el uso del tabaco. La condición tisular de esta

lesión puede hacer ver una lesión como simple cuando histopatológicamente se presentan cambios displásicos(35). Histopatológicamente se puede presentar; hiperqueratosis, estrato corneo engrosado, marcada pigmentación capa cornea, y proyecciones epiteliales bulbosas. El tejido conectivo subepitelial se puede presentar sin infiltrado inflamatorio.

La OMS clasifica las leucoplasias como homogéneas, moteadas (combinan expresiones de leucoplaquia y eritroplaquia) y nodulares, estas últimas con gran poder de transformación(33) Tabla 1

Tabla 1. Criterios de la OMS para clasificación de las lesiones precursoras de cáncer oral

Clasificación OMS 2005	Neoplasia Intraepitelial Escamosa	Clasificación Lesión Intraepitelial Escamosa
Hiperplasia de células Escamosas		Hiperplasia (simple) de células Escamosas
Displasia Leve	NIE -1	Hiperplasia de células Basales/parabasales
Displasia Moderada	NIE-2	Hiperplasia Atípica
Displasia Severa	NIE-3	Hiperplasia Atípica
Carcinoma <i>in-situ</i>	NIE-3	Carcinoma <i>in-situ</i>

Clasificaciones de Leucoplasia según *Grinspan* ,referenciado por *Aguas HE*, se diferenciado en tres grados(34):

Grado I: mancha blanca, bien delimitada, color blanco mate, superficie ligeramente áspera y aspecto en empedrado, histológicamente se presenta como hiperqueratosis.

Grado II: La superficie se sobre expresa en forma de placa, hay engrosamiento de la capa cornea, el color es un poco más blanco- amarillento, límites precisos.

Grado III: lesión blanca, verrugosa, proliferante, aspecto de coliflor, histológicamente hay hiperqueratosis, verrugosidades y papilomatosis o proyecciones papilares más pronunciadas.

La leucoplasia bucal es una lesión precancerosa bien conocida debido a su asociación con la presencia de displasia epitelial y su tendencia a la transformación maligna ^{25,34}

1.5.1 Leucoplasia con displasia epitelial: es consistente en todo lo anterior más un aumento de atipias nucleares, hiperchromatismo, alteraciones de forma y tamaño celular, disqueratosis (perlas de queratina) e hiperparaqueratosis, además con infiltrado inflamatorio.

Desde el punto de vista molecular, en modelos recientes relacionados con la génesis tumoral, se presentan múltiples transformaciones los cuales activan oncogenes que estimulan el crecimiento celular y genes supresores de tumores que se inactivan y promueven a una transformación neoplásica. Es típico observar la sobreexpresión del gen *p53* en el carcinoma epidermoide bucal, más que en otro tumor maligno humano (15-60 %), y además se ha encontrado en lesiones como la Leucoplasia. Por lo tanto reconocer el papel etiológico de las leucoplasias y su estadio (leve, moderado y severo), es importante para detectar prematuramente una lesión severa (36). Un meta-análisis hecho por *Miller et al 2001* (37) con 94 estudios (n=4580), determinó VPH en leucoplasia no-displásicos en 20% y en leucoplasia oral displásica en 26%. Existen otros estudios que soportan la presencia de VPH oncogénico en lesiones precursoras, como los revisados por Chaudhary AK (38) descritos en la **Tabla 2**, donde se observa la presencia de virus oncogénicos en este tipo de lesiones.

Tabla 2. Prevalencia de VPH en lesiones premalignas de cabeza y cuello

Autores	Año	Casos VPH +	%	Tipo de Lesión	Modo de infección
<i>Holladay & Gerald</i>	1993	13/46	28.10	Hiperplasia con displasia inflamatoria	PCR
<i>Nielsen et al</i>	1996	20/49	40.8	Displasia y Leucoplasia.	Inmunohistoquímica y PCR tipo 16
<i>Wen et al</i>	1997	5/17	29.4	Papiloma, leucoplaquia,	E6 VPH 16/18 PCR
<i>D'Costa et al</i>	1998	27/80	33.8	Leucoplaquias, Liquen Plano, Fibrosis submucosas.	L1 PCR
<i>Bouda et al</i>	2000	29/34	85.2	Hiperplasia displasia	Nested consensos PCR
<i>Ha et al</i>	2002	1/102	1.0	Displasia epitelial	PCR
<i>Ostwald et al</i>	2003	72/118	22.2	Leucoplaquia	PCR/Southern Blot hibridación
		65/118	15.4	Leucoplaquia	
<i>Lo Muzio et al</i>	2004	6/ 7	85.7	Leucoplaquia Oral	Nested PCR, IHC
<i>Campisi et al</i>	2004	68/139	17.6	Oral Leucoplaquia	PCR
		71/139	19.7	Liquen Plano	PCR
<i>Chen et al</i>	2006	10/23	52.6	Fibrosis submucosas.	PCR
<i>Furrer et al</i>	2006	9/22	41	Lesiones potencialmente maligna y malignas de cabeza y cuello.	PCR- Southern Blot
<i>Giovannelli et al</i>	2006	50/116	22	leucoplaquia Oral	PCR
<i>Luo et al</i>	2007	14/46	30.4	Lesiones Pre-cancerosas	Nested PCR, gene-chip arrays

Fuente: Chaudhary AK; Role of human papillomavirus and its detection in potentially Malignant and malignant head and neck lesions: updated review (38)

1.5.2 Liquen plano: Considerada por la OMS como lesión precursora de cáncer, de etiología desconocida, con respuesta autoinmune ante los queratinocitos basales. Forma vacuolizaciones hidrópicas, rompe las uniones celulares basales, presenta con áreas con hiperqueratosis y áreas atróficas que afecta la piel, las uñas, el cuero cabelludo y mucosas orales. Posee un porcentaje de transformación de un 6.3% al 12,3% (34)(39)(40)(41)

1.6 LESIONES BENIGNAS VERRUGOSOPAPILARES.

El VPH por ser epiteliotrópico puede inducir a lesiones hiperplásicas, papilomatosas y verrucosas en el epitelio escamoso estratificado de la piel y las mucosas (42). Las expresiones clínicas por lo general son asintomáticas, varían de acuerdo al grado de queratinización, generando coloraciones desde blanquecinas, blanco pálido, hasta el color rosado de la mucosa. De acuerdo al aspecto superficial pueden presentar bordes pronunciados e irregulares, sésiles o pediculadas, regularmente pequeñas pero pueden oscilar desde pocos milímetros hasta varios centímetros y pueden ser únicas o múltiples.

Topográficamente se ubican en cualquier parte de la cavidad oral, tanto en mucosa queratinizada como no queratinizada, siendo la zona de menor frecuencia el dorso de la lengua. El papiloma escamoso, el condiloma y la hiperplasia epitelial focal, son patologías relacionadas con la presencia del VPH, como se hace referencia a continuación:

1.7 HIPERPLASIA EPITELIAL

Es un aumento en el grosor del epitelio, con alto índice mitótico en la capa basal, presenta orto o paraqueratosis y un estroma con infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario, y a veces agudo (12) Con imposibilidad de ser eliminada mediante el simple raspado, a diferencia de candidiasis pseudomembranosa. El estímulo del cambio celular puede ser debido a causas traumáticas, en gran porcentaje relacionada con uso de prótesis, hábitos, entre otras. (10)

1.7.1 Hiperplasia pseudoepiteliomatosa: es una proliferación excesiva, aunque benigna, del epitelio plano, que se asemeja, desde un punto de vista histológico, con la proliferación presente en un Carcinoma Epidermoide.

1.7.2 Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck. Se constituyen masas múltiples nodulares de tejido blando, a manera de pápulas diminutas, se distribuyen sobre la superficie mucosa labial y lengua. Se observan blanquecinas o también del color de la mucosa. También se describen como crecimiento exofítico, redondeadas, de superficie lisa, frecuentemente agrupadas, pueden ser tan confluentes que producen placas elevadas con aspecto de adoquín(43). Son lesiones asintomáticas que se descubren por casualidad y se presentan con mayor frecuencia en niños y pacientes jóvenes. Están relacionados con subtipos 13 y 32 del VPH. Tienen bajo potencial de progresión maligna adoquín(44).

Figura 2.

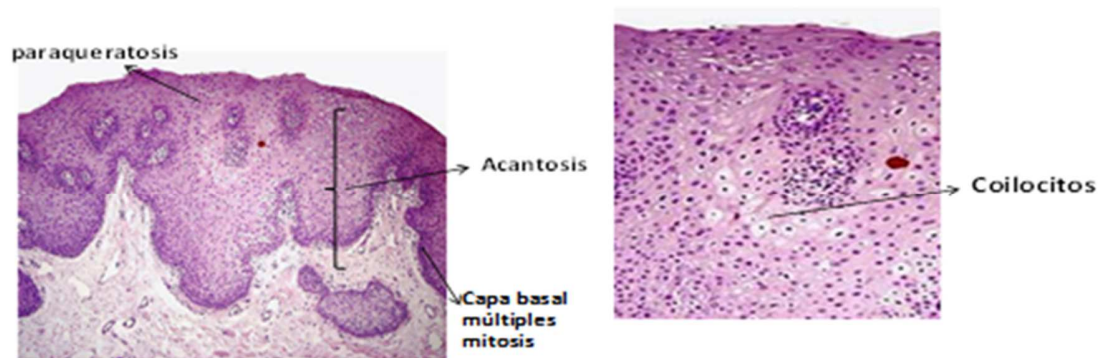
Figura 2. Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck



Fuente. Archivo clínico Aristizábal G, 1998.

Desde lo histopatológico se encuentra una capa gruesa de hiperqueratosis o paraqueratosis, acantosis pronunciada, en estrato espinoso se encuentran células vacuoladas con citoplasma claro y núcleo agrandado que sugiere presencia de VPH, la capa basal se presenta aumentada actividad mitótica, siendo patognomónico la presencia de células mitosoidales, en ocasiones se observan bordes epiteliales fusiformes que semejan dedos en palillo de tambor y anastomosis con orientación basal. El tejido conectivo es laxo, vascularizado y con presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario(10) (44)· Figura 3.

Figura 3. Características histopatológicas de la hiperplasia epitelial focal



Fuente. [http://actasdermo.org/es/flat-papules-on-the-lip\(45\)](http://actasdermo.org/es/flat-papules-on-the-lip(45))

1.7.3. Papiloma (Papiloma escamoso o Papiloma Plano). Son crecimientos de epitelio y pequeñas cantidades de tejido conectivo. La mayoría se relaciona con el virus del papiloma humano (VPH) que causan verrugas cutáneas, otros tipos de VPH asociados con papilomas pueden ser 2, 6 ,11. Estas lesiones presentan diversas manifestaciones clínicas y cambios histológicos como:

Verruga común: papiloma escamoso.

Verruga plana: papilomas conjuntivales.

Condilomas: hiperplasia epitelial local.

Neoplasias.

A nivel de cavidad oral, los papilomas se denominan papilomas escamosos y se ubican con mayor frecuencia en el paladar duro, paladar blando y la úvula, con relativa frecuencia en encía y mucosa oral de carrillo. Miden menos de 1 mm, tienen forma, exofítica, redondeada, papilar y de colíflor o estructura arboriforme. Pueden ser solitarios o múltiples. El color varía entre rosado a blanco, dependiendo de los niveles de queratinización y vascularización. Figura 4.

1.7.4 Verruga común o vulgar o verruga infectiva: se manifiesta en piel, con características indistinguibles al papiloma escamoso, de forma papilomatosa y base sésil y surgen por autoinoculación al morderse áreas de contagio como las manos y dedos (43). Figura 5.

Figura 4. Papiloma escamoso



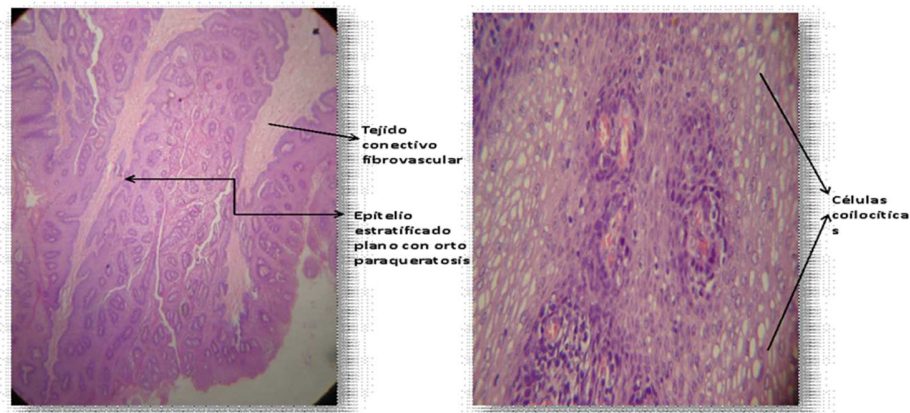
Figura 5. Verruga común



Fuente. Archivo clínico Dolly Aristizábal G, 2005

Se observa un epitelio escamoso estratificado hiperplásico, en un 80% presentan ramificaciones secundarias y terciarias cubiertas por ortoqueratina, paraqueratina o ambas, las proyecciones papilares pueden ser largas y digitiformes de forma papilar o corta, roma o redondeada. Se observan figuras mitóticas ocasionales en las células de la capa basal y presencia de células coilocíticas en las capas más superficiales. La secuencia de maduración varía o puede verse afectada en mínimo o mayor grado. El tejido conectivo subyacente es fibroso y contiene un moderado infiltrado inflamatorio mononuclear. Vasos sanguíneos de pequeño calibre. Este componente se observa como un núcleo central (46)(47) Figura 6.

Figura 6. Características histopatológicas del Papiloma escamoso



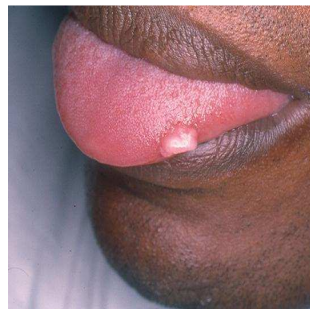
Fuente Archivo fotográfico de Odontóloga Dolly Aristizabal G, 2005

1.7.5 Condiloma Acuminado: Lesión infecciosa que se localiza en la región anogenital y mucosa bucal. Esta lesión se caracteriza por una superficie escamosa tibia y húmeda. En sus etapas iniciales presenta un grupo de nódulos rosados que crecen y se unen, lo que da un crecimiento papilar blando, de base amplia, exofítica que puede ser queratinizado o no. Figura 7.

Aumenta su frecuencia en presencia del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). Se relaciona con los tipos 6 - 10 y 11 de VPH, que infectan los queratinocitos. Las vías de transmisión pueden ser por contacto bucogenital, con individuo infectado o autoinoculación. La frecuencia de condilomas en la población infantil ha mostrado un incremento, que probablemente corresponde con el aumento en la población adulta. Se ha planteado que estas lesiones en niños pueden ser posible evidencia de abuso sexual; sin embargo, estudios en población neonatal, reportan la transmisión por vía vertical, auto inoculación o por fómites(42).

Histopatológicamente se observan proyecciones papilares que se extienden desde la base de cada lesión, están cubiertas por epitelio escamoso estratificado, con frecuencia paraqueratósico, aunque en ocasiones no es queratinizado. Las células epiteliales superficiales presentan núcleos picnóticos y crenados, que suelen estar rodeados de una zona edematosa clara y constituyen las denominadas células coilocíticas, que al parecer indican alteración viral. La capa epitelial es hiperplásica y no presenta evidencias de alteraciones displásicas o premalignas; el estroma subyacente está bien vascularizado y puede contener pocas células inflamatorias de tipo crónico.(12) (46)

Figura 7. Condiloma Acuminado



Fuente. Archivo clínico Dolly Aristizábal G, 1998

Con frecuencia es imposible demostrar viriones intactos en los núcleos o el citoplasma de las células infectadas mediante estudios ultraestructurales; sin embargo, se observan numerosas alteraciones degenerativas que incluyen depósitos fibrilares o filamentos intranucleares y vacuolización citoplasmática. Con relación a la epidemiología de estas lesiones verrugosas papilares, se determina la presencia más prevalente en la lesión de papiloma escamoso, diagnosticado tanto clínica como histopatológicamente(12)

Este grupo de lesiones están consideradas por la literatura como de comportamiento “benigno”, con presencia de virus de bajo riesgo. Con la aplicación de múltiples técnicas moleculares para detección de otros tipos virales,

se ha reportado la presencia de VPH de alto riesgo más frecuente el tipo 16. Es así que estudios como el de *González et al* en el 2007(3) , detectaron la presencia de VPH en lesiones “benignas”. *Syrjanen et, al* (48)determinaron la presencia de VPH-16 en 17.8% en Papilomas, Condilomas e Hiperplasia Epitelial Focal y en Hiperplasias Fibrosas

Como se muestra en la tabla 3, varios autores determinaron la relación VPH de alto riesgo y las lesiones verrugosopapilares.

Tabla 3. Relación del virus VPH+ en lesiones verrugosopapilares

Tipo de lesión	%	Tipo VPH	Población	Autor/año
Hiperplasia epitelial	2,83	16	3/106	Aristizábal D y col 2016
	1,1	16	1/106	Mvarak et al 2013
	6,66	16/11/2013	3/45	Syrjanen et al 1987
Papiloma/Condiloma	7,54	16	6/106 y 2/106	Aristizábal D y cols 2016
	2,9	16-31-33-52	6/204	Mvarak et al 2013
	7,5	16	8/105	García et al 2009
	8,9	16/11/2013	4/54	Syrjanen et al 1987

En las lesiones precursoras de Cáncer oral la prevalencia de VPH oscila entre 10 a un 80% en formas pre-neoplásicas(48). Otros estudios detectan VPH en 90% en lesiones benignas, 51.5% en lesiones premalignas y en neoplasias 60%. Estos autores en estas lesiones hallaron VPH alto riesgo en un 30%; 58%y 43% respectivamente (49).

Criterios de Toki: Es un sistema de evaluación sistemático creado por *Toki T, Yajima/1987*,(50) que adjudica un valor estimado en la presencia de varias características celulares y estructurales histopatológicas, asociados con la presencia de VPH. a nivel de cuello uterino. Luego *Josué Bermeo*(47) lo

acondicionó a la morfología de lesiones orales que incluyen el Papiloma Bucal (PB), Verruga Vulgar Bucal (VVB), Condiloma Acuminado Bucal (CAB), Hiperplasia Epitelial Multifocal (HEM) o enfermedad de Heck . Criterios que aunque no explican la posible naturaleza viral de las lesiones, ni permiten establecer el diagnóstico diferencial entre lesiones con VPH como Papilomas, Condilomas, los parámetros utilizados incluyen características relacionadas con este grupo de lesiones. Sugestivas de VPH, PE, CA, VV. Una lesión presenta asociación con VPH si presenta la sumatoria de seis o más criterios de Toki. (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de Toki (Fuente: Toki T, Yajima/1987)

Característica	Valor
Coilocitosis	4
Bi y Multinucleación	2
Acantosis	1
Disqueratosis	1
Papilomatosis	1
Hiperplasia basal	1

A pesar de presentarse muchas dudas en relación al proceso de infección y etiología en cavidad oral, con relación al VPH de alto riesgo, su presencia está implicada en mucosa sana, lesiones benignas, que incluyen el Papiloma Bucal (PB), Verruga Vulgar Bucal (VVB), Condiloma Acuminado Bucal (CAB), Hiperplasia Epitelial Multifocal (HEM) o enfermedad de Heck, y lesiones premalignas y/o malignas que incluyen leucoplasia y Carcinoma Espinocelular y escamocelular.(48)(49)

Desde el punto de vista histológico en la mucosa oral de todas las regiones se destacan dos capas distintas desde el punto de vista morfológico y embrionario.

- Epitelio estratificado plano mucoso y en algunas zonas se presenta queratinizado.
- Lámina propia compuesta de tejido conectivo areolar que

contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, llamado también Corion. En algunas zonas se puede presentar una tercera capa, la c. Submucosa, conformada de tejido conectivo laxo, con otros componentes como glándulas, tejido adiposo, vasos y nervios. La encía y el paladar no presentan submucosa (51) Se presentan tres tipos de mucosa específicas, es así como la Mucosa masticatoria, está compuesta por epitelio estratificado plano queratinizado, la Mucosa de revestimiento, compuesta por un epitelio estratificado plano no queratinizado o mucoide y la Mucosa especializada, sus características arquitecturales implican una morfología especial hay receptores del sabor, denominados botones gustativos y presenta papilas linguales(52). Esta diversidad de epitelio permite por un lado con la queratinización, proteger el entorno del ataque viral en colaboración con la saliva, por contener metabolitos como lisosomas, lactoferinas, IgA y citosinas, por tanto el tiempo de contacto del virus puede reducirse, teniendo en cuenta la respuesta adecuada del sistema inmune(53). Y por otro lado epitelio mucoide sin queratina que al menor roce produce microabrasión que permite la entrada viral.

Por ser el VPH un virus epiteliotrópico, la piel y mucosas son sitios afines, su papel en la carcinogénesis implicado con la presencia de tipos oncogénicos especialmente 16 y 18 en mucosa normal está generando cada vez persistente investigación. Por cuanto aún no está clara la etiopatogenia a nivel oral. A continuación se relacionan estudios que muestran la presencia del VPH la cual oscila entre 0 y 80% (54) (Tomado de *Ezquinazi et al .2010*). Tabla 5.

Tabla 5. Infección por VPH en mucosa normal

Autor Año	Edad	Muestra	Método	Técnica	n	VPH Positivo	%	Genotipo VPH
Jenison et al., 1990	Adultos	Mucosa Oral	Raspados	PCR	35	11	31%	6,16
Jalal et al., 1992	Adultos	Mucosa	Raspados	PCR	48	25	52%	16
Badaracco et al 1998	Adultos	Mucosa Oral	Raspados	PCR	22	4	18%	6,11,16,31
Schwartz et al, 1998	Adultos	Mucosa Oral	Raspados	PCR	435	39	9%	6,11,16,18,31,33,35
Smith et al., 1998	Adultos	Mucosa Oral	Enjuague	PCR	205	10	4,80%	12,16,23,
Terai et al., 1999	Adultos	Mucosa Oral	Raspados	PCR	30	30	100%	6,16,18,59 61
Smith et al., 2000	Adultos	Mucosa Oral	Enjuague	PCR	333	61	10,80%	16,18,31,58
Mancilla y col. 2012	Jóvenes	Mucosa Oral	Hisopados	PCR	49	21	42.8%	16
Aristizábal y col 2016	Jóvenes	Mucosa Oral	Hisopados	PCR	49	22	44.8%	16

Fuente: Esquenazi D, et al. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. Braz J Otorhinolaryngol. 2010 (55)

1.8 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Pertenece a la familia Papillomaviridae, del género de los Papilomavirus, especie 9. Es un virión esférico que mide 50 nm de diámetro. Contiene 8.000 pares de Kb, 200 subtipos, sin embargo, solo se ha secuenciado el genoma completo de unos 100 tipos(55). Es un virus epiteliotrópico que puede inducir lesiones hiperplásicas, papilomatosas y verrucosas en el epitelio escamoso estratificado de la piel y las mucosas.

1.8.1. Estructura del Virus del papiloma humano. El VPH, presenta un genoma constituido por una doble cadena de ADN, forma circular, es característico en ellos presentar su información genética codificada en una sola de las cadenas,

porque su la transcripción en unidireccional. Estos virus codifican dos tipos de proteínas: 1. Proteínas Tempranas (Early) así:

E1 y E2: las cuales participan en la regulación de la replicación viral

E2: participa en la transcripción del ARN

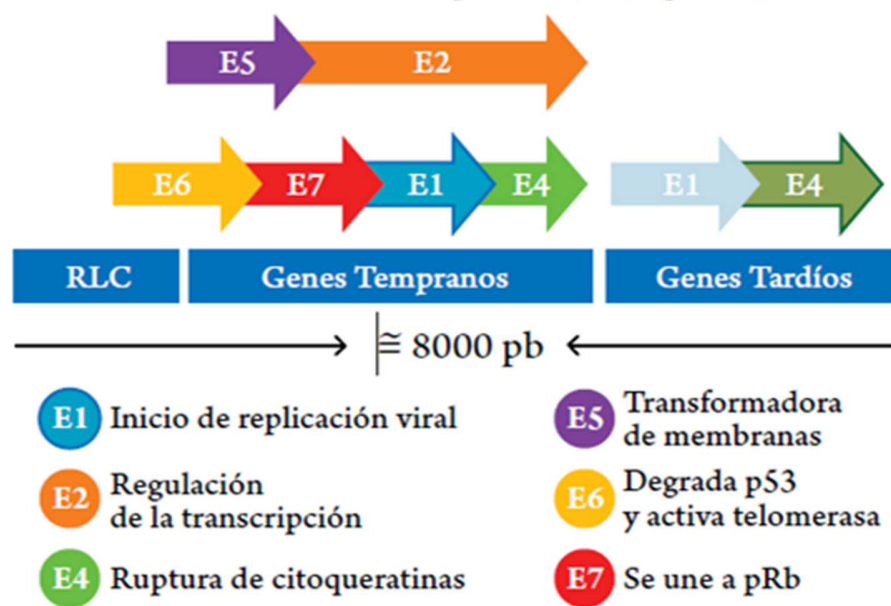
E5, E6, E7 transformación celular

2. Proteínas Tardías (LATE)

L1 y L2 encargadas del ensamble de la capsula viral.

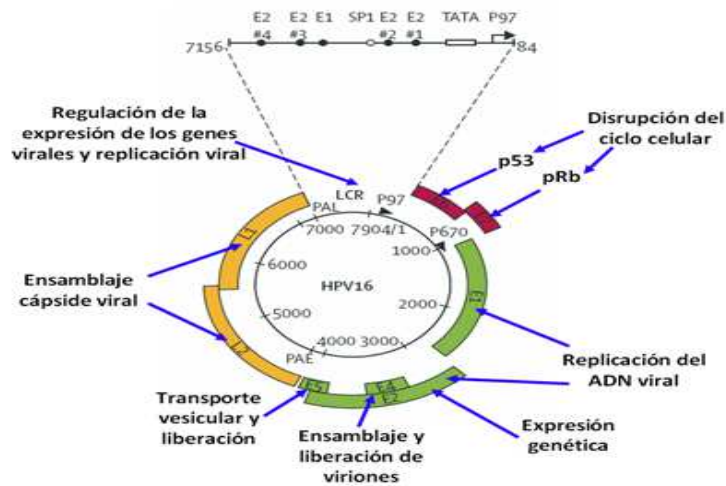
Su genoma además, presenta una región larga de control, que contiene elementos de regulación para la transcripción y replicación viral. La estructura y sus funciones del VPH son más claramente observadas en las figuras 8 y 9 .(55)(56)

Figura 8. Papel de los genes que conforman el Genoma del VPH



Fuente. Tomado de García et al, 2009(57)

Figura 9. Esquema Genómico del virus del Papiloma Humano.

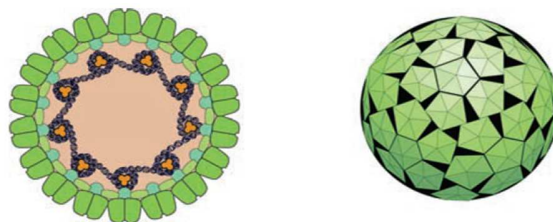


Fuente: Human papillomavirus and cervical cancer, Schiffman, 2007(55)

Genoma: ADN de doble Cadena, se empaqueta como un "minicromosoma" con histonas nucleosomales. con una nucléocápside icosaédrica, conformado por 72 capsómeros, pentámeros de L1 y carente de envoltura (Desnuda) (56)(38)

Figura 10

Figura 10. Estructura de la cápside viral



Fuente: Acheson, N.H., Fundamentals of Molecular Virology (56)

1.8.2. Mecanismos de patogénesis y oncogénesis. EL VPH se trasmite con mayor frecuencia por vía sexual, considerada una de las enfermedades de transmisión más común en todo el mundo. Este virus tiene tropismo por las células

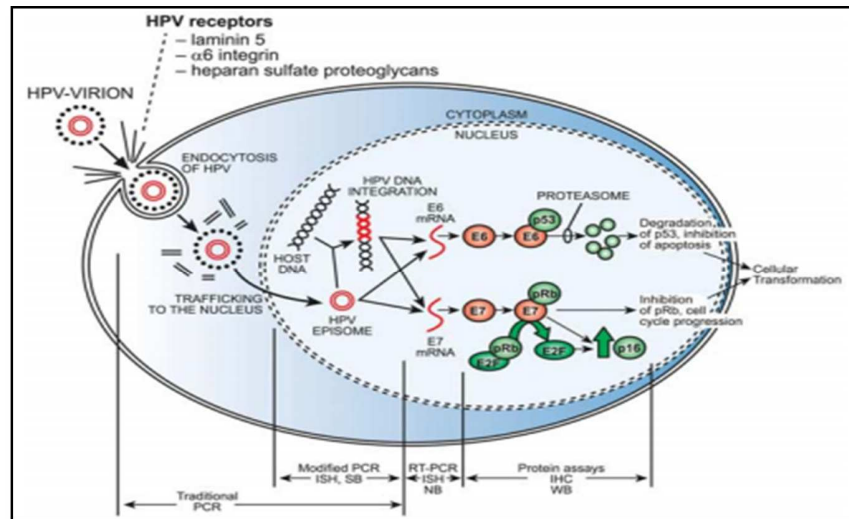
epiteliales que se encuentran en la mucosa oral normal, probablemente en estado latente, lesiones benignas, premalignas y malignas. De los 200 subtipos de *Virus de Papiloma Humano*, 40 infectan de forma específica la mucosa genital y oral(57).

La mayoría de las infecciones se producen transitoriamente, ya que es neutralizada por la respuesta inmune del hospedero, solo entre 10 y 20 % son persistentes y tienen un mayor potencial oncogénico. Este agente infeccioso puede infectar las mucosas bucal, laríngea y cervical, así como los genitales externos.(58)

El VPH entra a las células de los estratos bajos del epitelio a través de lesiones (59), o abrasiones del tejido a través de un receptor de membrana o $\alpha 6$ -Integrina el virus se integra al núcleo de células basales hospedera. El ADN viral permanece circular o en estado episomal o extracromosomal en el hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular(60).

EL VPH al encontrarse en el medio intracelular pierde su cápside. Luego su genoma entra en el núcleo y gana la capacidad para codificar la estructura celular y sintetizar proteínas las cuales darán origen a cápside, ácidos nucleicos y las enzimas necesarias para producir nuevos virus, los cuales quedan libres para infectar nuevas células. Las células infectadas cuando se diferencian y migran hacia el estrato espinoso del epitelio y se infectan nuevas células. Cuando no ocurre la muerte celular posiblemente darán lugar a una infección crónica(38). Los viriones se acumulan dentro del núcleo. Después de integrado el virus expresa genes tempranos (*E*) a lo largo de todos los estratos epiteliales. Los genes tardíos (*L*) los expresan sólo en los queratinocitos ya diferenciados y superficiales, donde el ensamblaje de las cápsides virales forman viriones(61)(62) . Figura 11.

Figura 11. Mecanismo del VPH asociado a Carcinogénesis Oral.



Fuente: Rautava J, SS. Human papillomavirus infections in the oral mucosa.(60)

El estado de diferenciación de las células escamosas infectadas permite expresar los genes tempranos al transcribir las proteínas virales E6 y E7, muy comunes en los carcinomas. Estas proteínas intervienen en la regulación de la proliferación celular normal, alterando la función de las proteínas pRb y P53, que actúan como supresoras de tumores en las células normales.

En los nuevos reconocimientos moleculares los intervinientes *p63* y *p63* N-terminal encontrando epítopes aún más específicos sobre los que se determina una responsabilidad directa en éstas alteraciones como es el SFI-6 (63) expresados en carcinomas cervicales por técnicas de inmunohistoquímica.

La sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 estimula a un crecimiento incontrolado con potencial de transformación maligna y en los queratinocitos ejercen una acción directa en el ciclo celular a una progresión genética en el

Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello (CECCC). El gen p53 se ha determinado su efecto mutante en el 45% de los casos de CECCC(62).

Cuando se presentan factores como alta carga viral en infecciones por VPH son capaces de producir grandes cantidades de unidades de proteína E6 y E7, y en pacientes inmunológicamente incompetentes o con depresión del sistema inmune, cuando se altera la función de p53, p63 y Rb el riesgo de transformación maligna es mucho mayor.(38)(62)

La replicación del VPH es diferente dependiendo del tipo de lesiones:

En lesiones benignas: el genoma del VPH se integra de forma episomal extracromosómico (plásmido) (64)

En lesiones malignas; el ADN viral se integra en el cromosoma del hospedero. En el cáncer, el genoma del VPH puede encontrarse de forma episomal, integrado o de ambas formas (4)(57)

Las formas episomales permiten grandes porcentaje de subdiagnóstico de la infección por VHP, debido a que en las pruebas moleculares se detecta solo el genoma de VPH cromosomal o integrado a las células hospederas en los tejidos, mas no la forma episomal del VPH (forma circular, no integrado al DNA celular), condición de la infección indetectable por métodos tradicionales. Es importante mencionar que la detección de estas formas episomales o extracromosomicas del VPH, permitirá encontrar formas del virus en lesiones benignas y en efecto prevenir de alguna u otra manera, el potencial transformador del virus en las células hospederas.Lastimosamente las técnicas diagnósticas no identifican el VPH episomal o el que ya está integrado en la célula, aunque ya se han diseñado protocolos para hacer esta distinción (65)

Algunos autores sugieren que los VPH de alto riesgo asociados a cánceres de vías aéreo digestivas superiores (VADS) (38)(64), pueden ser similares pero no idénticos a los VPH asociados al cáncer de cérvix. Más recientemente se ha encontrado que el VPH 18 es más oncogénico que el VPH 16, aunque éste último es más prevalente (Nivel de evidencia III)(66) . Se conoce que algunos subtipos de VPH16 asociados a los carcinomas de cabeza y cuello tienen unas alteraciones características en la región del promotor/ realizador que los hace particularmente activos en los queratinocitos orales. Recientes datos epidemiológicos y moleculares sugieren que la infección del VPH de las VADS puede promover la génesis tumoral en cabeza y cuello (64)(66).

1.8.3. Diagnóstico de la infección por VPH. Existen varias pruebas diagnósticas para detectar la infección por VPH: Citología, histopatología y pruebas de biología molecular e inmunohistoquímica.

1.8.3.1 La pruebas de sospecha de infección viral. Estas pruebas incluyen estudios citológicos exfoliativos y los histopatológicos a partir de biopsias de tejido, permiten observar la morfología celular con cambios ocasionados por la infección por VPH, como se observa en los coilocitos característicos por tener vacuolas perinucleares, el núcleo agrandado, irregular e hipercrómico, y posible binucleaciones (*Meissels y Fortin, 1976*) (67) .

La citología exfoliativa (hisopo, cepillado, raspado): detecta cambios morfológicos celulares afectados por el VPH.

Diagnóstico histopatológico: Las biopsias permiten determinar un diagnóstico histopatológico con la limitante de no proveer información sobre el genotipo del virus infectante, además de los falsos negativos ante la no detección del virus en las células.

1.8.3.2 Pruebas de detección viral. Se han diseñado varias pruebas que difieren en su sensibilidad, especificidad, valores predictivos, y complejidad técnica. Entre ellas: Imunoperoxidasa, la Hibridación *in situ* con fluoresceína (FISH), el Southern Blot, la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la prueba de Captura híbrida que no solamente mide la carga viral sino que detecta y diferencia entre virus oncogénicos y no oncogénicos(55)(68). Para alcanzar la sensibilidad y especificidad se han incrementado los esfuerzos biológicos, bioquímicos, biomoleculares, inmunológicos, tecno genéticos en la detección de los tipos de VPH. Entre ellos se encuentran:

La tecnología Invader, basada en hibridación de una sonda al ADN viral diana, entre las que se encuentran:

La Hibridación del ADN: Permite determinar la presencia de ADN viral mediante hibridación de sondas múltiples (una contiene genotipos de bajo riesgo y otra los de alto riesgo, tienen limitada sensibilidad y no permite el genotipo exacto).

Hibridación *in situ*: puede detectar más de 10 copias de ADN por célula viral.(38)(65)

Hibridación Southern blot: puede detectar de 1 a 10 copias de ADN viral.

Reacción en Cadenas de la Polimerasa (PCR): (Polymerase Chain Reaction, en inglés) obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una secuencia molde; la PCR es considerada la técnica más sensible para la detección del ADN viral en especímenes clínicos. Por presentar una heterogeneidad a nivel de nucleótidos entre los diferentes genotipos VPH, el desarrollo de una prueba universal PCR simple ha sido difícil, ante la no detección de todos los genotipos de VPH. A pesar de esto, los métodos de PCR han sido desarrollados permitiendo la detección de un amplio espectro de los principales genotipos de VPH mucotrópicos (62). Se descubrió que una combinación de

cebadores consenso GP5+ y GP6+ de la región L1, del VPH-6,-11,-16,-18,-31 y 33, amplifican el ADN viral de por lo menos 27 genotipos mucotrópicos de VPH bajo riesgo.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de los amplificados (PCR-RFLP): el ADN del virus, se extrae y se purifica. Se amplifica un gen específico mediante PCR, luego con la reacción es tratada con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Estas enzimas de restricción hacen un proceso de digestión restrictiva en el cual reconocen cortas secuencias específicas en el ADN permitiendo así detectar los polimorfismos presentes (48)

Actualmente el uso de marcadores de ARN, de ADN y de Proteínas, se está implementando debido a su precisión en estado vital, evolución de las lesiones y la respuesta inmune a la infección del VPH. (69)

Otras formas diagnósticas de la infección de VPH son los métodos Inmunológicos, que determinan la presencia de anticuerpos contra VPH, pero está limitada por que no detecta los genotipos que producen la infección. Son de mayor utilidad para estudios epidemiológicos. Actualmente *Goar Gevorkian et al* desarrollan un método que permite detectar el VPH de manera sencilla y económica, mediante la detección de anticuerpos anti- VPH en muestras de secreciones, como la saliva de las pacientes con infección y cáncer cérvico-uterino(70).

Las pruebas moleculares para detectar la presencia de VPH, son las de mayor uso diagnóstico para identificar genotipos, donde se requiere previamente evaluar la calidad del ADN mediante tecnología de punta importante para su precisión.

Evaluación, concentración y pureza de ADN: La cuantificación del ADN se realiza mediante el espectrofotómetro NANODROP (*Desjardins et al 2010*)(71), que

determina la concentración y pureza de ADN con una alícuota de 1 uL de ADN, proporcionando una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas. La ventaja de este método, es que no solo determina la concentración de ADN, sino evalúa la pureza o grado de contaminación. La relación 260/280 permite establecer la contaminación de la muestra con proteínas y la relación 260/230 que permite establecer la contaminación de la muestra con químicos.

Para poder cuantificar y determinar el grado de contaminación de cada muestra se han establecido intervalos o valores óptimos que indican al investigar la calidad de ADN.

2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA

El cáncer bucal y bucofaríngeo comprende un grupo importante de patologías de alta morbimortalidad, que representa un 50% de las malignidades de cabeza y cuello y se ubica entre los diez primeros tipos de cáncer en el mundo. En la mayoría de los casos este tipo de cáncer se desarrolla en los dos tercios posteriores de la lengua, en la base y en la zona amigdalina. Las lesiones con diagnóstico histopatológico de Carcinoma Escamocelular Oral (CEC) corresponden al 90% de los casos de este tipo de cáncer. Esta patología es de origen multifactorial y los factores asociados pueden ser genéticos y ambientales. El consumo excesivo de alcohol y el uso frecuente de tabaco son los principales factores de riesgo. Su prevalencia varía en un rango muy amplio en el mundo y su incidencia anual es dos veces mayor en hombres y 1.5 mayor en países desarrollados (8). La tasa de mortalidad es elevada en relación a la incidencia, si se compara con otros tipos de cáncer como de mama y de próstata. Esta alta mortalidad es debida principalmente a que la detección temprana sólo se da en un bajo porcentaje por ser asintomático en los primeros estadios. Un alto porcentaje (65 al 75%) de casos de cáncer oral son detectados en los estadios avanzados, cuando el tratamiento no garantiza un buen pronóstico y afecta la funcionalidad del aparato estomatognático y la calidad de vida del paciente (16). Un porcentaje entre 20% y 30% de los casos que desarrollan CEC en cavidad oral, no han estado expuesto a los factores de riesgo ya establecidos para ésta patología. (3)(20). Debido a los datos epidemiológicos se considera que existen otras etiologías para este tipo de cáncer, entre las cuales está la infección por *Virus del Papiloma humano* (VPH). La similitud histopatológicas entre las regiones de cérvix y cavidad oral, el hallazgo del ADN y de proteínas oncogénicas virales en las células tumorales son evidencias del posible papel de VPH en la carcinogénesis bucal (20)(6)

3. JUSTIFICACIÓN

El VPH es una de las principales infecciones de transmisión sexual en mujeres y hombres en el mundo y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera un problema de salud pública (8).

Los tipos de VPH han sido clasificados como de bajo y alto riesgo según su oncogenicidad. En este último grupo los más frecuentes son los tipos 16 y 18 presentes en carcinoma escamocelular de cérvix. Desde el año 1994 estos tipos de VPH también se han relacionados con un subgrupo de cáncer oral (16). En el año 2010 la Agencia Internacional de Investigación para Cáncer (IARC), en un estudio multicéntrico confirmó éstas asociaciones (72)(73).

El VPH también se ha detectado en lesiones benignas y en lesiones precursoras de cáncer de la cavidad bucal. Entre las lesiones bucales benignas asociadas a VPH se incluyen: Papiloma Bucal, Verruga Vulgar Bucal, Condiloma Acuminado Bucal, Hiperplasia Epitelial Focal, Hiperplasia Fibrosa, Hiperplasia Papilomatosa. Un grupo de lesiones frecuentes como Queratosis, Liquen Plano Oral (3)(34), están asociadas con subtipos de VPH de bajo riesgo oncogénico generalmente, sin embargo se han encontrado en estas lesiones, asociación con subtipos de VPH de alto riesgo oncogénico con probabilidad de transformación (39)(48).

Su detección se dificulta debido a que sus expresiones son asintomáticas o subclínicas y pasan desapercibidas en la mayoría de los casos. El diagnóstico de VPH en biopsia es posible pero no se reconoce la especificidad del tipo infectante. Las pruebas moleculares confieren mayor sensibilidad, puesto que permiten identificar fragmentos del genoma viral en células infectadas, aun con un bajo número de copias virales. El desarrollo de técnicas de genómica y biología

molecular han generado un aporte convincente en la detección temprana de tal riesgo oncogénico (74).

Actualmente en Colombia son muy pocos los estudios epidemiológicos y moleculares que asocian el VPH con lesiones bucales (verrugasopapilares, precursoras de cáncer y carcinoma escamocelular)

Este estudio pretendió establecer la importancia del diagnóstico temprano del VPH de alto riesgo en lesiones bucales y contribuir al conocimiento de la patología de éstas lesiones, en términos de diagnóstico precoz y pautas de prevención y promoción en la salud bucal; Igualmente contribuir a dilucidar los mecanismos oncogénicos de VPH en el aparato estomatognático, además de fortalecer una línea de investigación encaminada a la realización de nuevos proyectos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del *Virus del papiloma humano* tipo 16 (VPH-16) en mucosa sana, en un grupo de pacientes y estudiantes asistentes a la clínica de Santiago de Cali de la ciudad de Cali y en biopsias parafinadas procedentes de lesiones verrugosopapilares, leucoplasia y carcinoma escamocelular de pacientes del suroccidente colombiano

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar sociodemográficamente el grupo estudiantes del programa de odontología y de pacientes de la clínica de Santiago de Cali de la Universidad Santiago de Cali, aportantes de las muestras de mucosa oral sana y el grupo de biopsias parafinadas de lesiones orales.
- Determinar la presencia de *VPH-16E7* en muestras de mucosa sana de la población de estudio y en las lesiones Verrugosopapilares, Papiloma Escamoso, Condiloma, Hiperplasia Epitelial, con diagnóstico histopatológico de VPH, leucoplasia y Carcinoma Escamocelular de las biopsias parafinadas del estudio.
- Estimar la asociación entre los principales factores de riesgo y la presencia de *VPH -16* en mucosa oral sana en el grupo de estudiantes y pacientes asistentes a la clínica de Santiago de Cali de la Universidad Santiago de Cali.
- Determinar la distribución topográfica de las lesiones Verrugosopapilares, Papiloma Escamoso, Condiloma, Hiperplasia Epitelial, con diagnóstico histopatológico de VPH, leucoplasia y Carcinoma Escamocelular.
- Caracterizar histopatológicamente las lesiones verrugosopapilares, Papiloma Escamoso, Hiperplasia Epitelial y Condiloma Acuminado *VPH-16* Positivas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de carácter descriptivo y exploratorio porque por medio de diagnósticos histopatológicos y de la técnica molecular de PCR, se reconoció la presencia de VPH. Se considera de corte transversal porque se tomaron muestras de mucosa oral en un periodo determinado para detectar la presencia de VPH. Además se considera también un estudio de corte retrospectivo porque el análisis histopatológico se realizó a partir de muestras parafinadas de años anteriores

5.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

En este estudio exploratorio el tamaño de muestra fue por conveniencia, tanto para mucosas oral sana como para las lesiones verrugosas papilares, leucoplasia y cancer, debido a que no se conoce la incidencia ni la prevalencia en nuestra región de la infección por VPH. Para un total de 70 muestra de mucosa sana y 198 biopsias parafinadas pertenecientes al periodo de los años 2000 al 2014. El 94% de los bloques escogidos fueron del período 2007 al 2014.

5.3. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Esta investigación se realizó con participantes provenientes principalmente de la Ciudad de Cali y otras ciudades del Valle del Cauca. Se usaron 268 muestras de cavidad oral. El total de las muestras correspondieron a 70 hisopados de cavidad oral tomadas a pacientes y estudiantes de la Clínica Odontológica de la Universidad Santiago de Cali, que participaron voluntariamente. En el estudio se incluyeron además 140 muestra de biopsias parafinadas procedentes de

consulta externa de dos patólogos y 58 muestras parafinadas de tumores de cavidad oral obtenidas del archivo del Departamento de Patología del Hospital Universitario Evaristo García. Como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Descripción de muestras de cavidad oral del estudio. N= 268

Tipo de muestra	Forma de recolección de la muestra	Cantidad	Sitio de recolección
Células de mucosa sana	Hisopado	70	Clínica Odontológica U. Santiago de Cali
Muestras de lesiones con Diagnóstico histopatológico sugestivo VPH y leucoplasia	Bloques parafinados	132	Consulta externa particular ¹
Muestras de lesiones con Diagnóstico de carcinoma escamoso	Bloques parafinados	58	H.U.V
		8	Consulta externa particular
Total		268	

¹ = Consulta externa particular de los patólogos orales Dolly Aristizábal y Carlos E. Tasamá

5.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

5.4.1 Criterios de Inclusión y exclusión: Los criterios de inclusión para las muestras de mucosa sana fueron voluntarios mayores de edad del sur occidente colombiano, de todos los grupos étnicos con mucosa libre de lesión clínica y sin compromiso sistémico y se excluyeron participantes en estado de embarazo inmunosuprimidos, y con datos sociodemográficos incompletos. Para las biopsias parafinadas se incluyeron Bloques parafinados de cavidad oral con diagnósticos histopatológico de Papiloma Escamoso(PB), Condiloma Acuminado (CAC), Hiperplasia Epitelial (HE), Verruga Vulgar Bucal (VVB), Leucoplasia y Carcinoma Escamocelular y se excluyeron bloques parafinados que no estuvieran

respaldados por datos sociodemográficos, con diagnóstico de neoplasias diferentes a Carcinoma Escamocelular y con muestras de tejidos poco representativas, además se excluyeron muestras que al realizarles procesos moleculares no se obtuvo adecuado ADN.

5.5 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.

5.5.1 Muestra en pacientes con mucosa oral normal. Previo lectura y comprensión de los objetivos del proyecto se procedió a la firma del consentimiento informado, registro y recolección de datos de cada paciente en una base de datos que incluyeron las siguientes variables:

Variables demográficas: Edad, género, etnia, escolaridad, estado civil, nivel de ingresos. Variables de Comportamiento social: Hábito de cigarrillo, consumo de alcohol. Variables de comportamiento sexual: Edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, práctica de sexo oral. Variables de antecedentes Gineco-Obstétricos: Número de hijos, Diagnóstico de VPH. Teniendo en cuenta que estas variables se pueden comportar como posibles factores de riesgo asociados a la infección con *Papilomavirus humano tipo 16* en cavidad oral (Anexo ENCUESTA). Luego se tomaron muestras por barrido, con hisopo de madera estéril y conservadas en 500 uL de solución de Lisis TES (Tris HCl 10 mM, NaCl 50 Mm, SDS 0.5%,) en un tubo Eppendorf (6) Estas muestras de mucosa oral fueron tomadas en la Clínica Odontológica de la Universidad Santiago de Cali. POE 001.

EL barrido extenso se realizó mediante hisopados constantes durante 30 segundos en toda la cavidad oral, principalmente al nivel de encías, zonas de frenillos, labiales superior e inferior, lengua, carrillos o buca, piso de boca y región amigdalina anterior(75). Figura 12

Figura 12. Toma de muestras de mucosa oral.



Fuente: Clínica Odontológico Universidad Santiago de Cali, 2013

Obtenidas las muestras, estas se transportaron conservando la cadena de frío, mediante una nevera portátil con pilas, al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Santiago de Cali, donde se conservaron a 4°C (Refrigerador Sanyo medico ®) y se les realizó la extracción de ADN. POE 002.

Una vez obtenido el ADN, se transportaron a la Universidad del valle de la misma manera, en nevera portátil sellada conteniendo pilas, con una duración de transporte de 40 minutos, de inmediato se guardaron en refrigerador Whirlpool.

5.5.2 Muestra de tejido parafinado. 140 muestras orales parafinadas de lesiones benignas, precursoras de cáncer y carcinoma escamocelular, se captaron de pacientes que asistieron a consulta externa, por remisión de dos patólogos (Aristizábal y Tasamá) en la ciudad Cali, distribuidas así: 132 correspondientes a lesiones verrugosopapilares y leucoplasia y 8 correspondientes a carcinoma escamocelular.

Además se obtuvieron 58 muestras parafinadas para estudio de la presencia en cáncer oral, del archivo académico del Hospital Universitario del Valle "Evaristo García"; de pacientes provenientes del suroccidente colombiano (www.patología.univalle.edu.co) (76) . Las biopsias incluidas en éste estudio fueron colectadas entre los años 2002 y 2014, con mayor cantidad de muestras en

el año 2013 (19.7%). El 89% de las biopsias tenían una antigüedad de seis años, para un total de 198 muestras parafinadas. Ver Tabla 6. Las muestras de las biopsias parafinadas estuvieron siempre a temperatura ambiente en un recipiente plástico y hermético confidencial. Una vez extraído el ADN de todas las muestras se conservó en solución TE (TRIS HCL 10 mM pH 7,8; EDTA 10 mM, pH 8,0) a -20 °C (Whirlpool).

Debido a que las biopsias parafinadas fueron extraídas de archivos, sólo se obtuvo información de edad, género y topografía anatómica, para realizar las diferentes asociaciones, como diagnósticos y características histopatológicas.

5.6 ESTUDIO HISTOPATÓLOGICO

5.6.1 Descripción del material parafinado. Se realizó la confirmación del diagnóstico histopatológico y la caracterización sociodemográfica de 198 biopsias parafinadas. El estudio histopatológico se realizó empleando de dos o tres cortes de 5µm de cada biopsia por placa, que fueron posteriormente coloreadas con Hematoxilina – Eosina. Cada muestra se identificó con un Código Único del Paciente (CUP). Las muestras del H.U.V se evaluaron dentro de la institución por políticas éticas. Las muestras de consulta externa se transportaron en bolsas plásticas herméticas (marca Zyploc) al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Santiago de Cali y al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Universidad del Valle.

5.6.2. Confirmación del diagnóstico histopatológico. El diagnóstico histopatológico para reconfirmación y selección de las muestras de papiloma, condiloma, hiperplasia epitelial, leucoplasia y carcinoma escamocelular, fue realizado por patólogos del Departamento de Patología de la Universidad de Valle, en el Laboratorio de Patología del H.U.V mediante microscopia de Luz (Olimpos, objetivo 4x, 10x y 40x). Solo se incluyeron aquellas muestras con

diagnóstico confirmado. Los registros fotográficos se manejaron con el microscopio de luz Leica® DM2750; con formato JPG, por medio del programa LAS V.3, propio de la cámara Leica del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle.

5.6.3. Caracterización histopatológica de lesiones Verrugosopapilares. Para el análisis histopatológico de las muestras con diagnóstico clínico de VPH: Papiloma, Hiperplasia Epitelial, Condiloma, se observaron las placas coloreadas (Hematoxilina y Eosina) de los archivos de la línea de base del estudio, por los especialistas patólogos orales: Tasamá y Aristizábal, se reconfirmaron en el Laboratorio de Patología del H.U.V mediante microscopia de Luz (Olimpus, objetivo 4x, 10x y 40x) por patólogos clínicos y de la Universidad de Valle, Armando Cortés y José Bravo de la Universidad del Valle.

Para la confirmación de los diagnósticos histopatológicos, con características de lesiones orales sugestivas de VPH, se tuvieron en cuenta los criterios de Toki's, acondicionados por Bermeo, aunque no explican la posible naturaleza viral de las lesiones, ni permiten establecer el diagnóstico diferencial entre las lesiones con VPH (Papilomas, Condilomas). Para las lesiones hiperplásicas/displásicas, hiperqueratosis y los diagnósticos de Carcinoma Escamocelular, se tuvieron en cuenta los criterios de la OMS(33). Las descripciones histopatológicas incluyeron la descripción de displasia, regidas bajos los términos de:

A. Cambios citopáticos de morfología de queratinocitos, células coilocíticas, mitosoidales, hipercromatismo capa basal, sin mitosis atípicas en una de las capas epiteliales. Grado I

B. Cambios citopáticos de morfología de queratinocitos, células coilocíticas, mitosoidales, hipercromatismo capa basal sin mitosis atípicas en dos o más capas epiteliales. Nivel II

C. Cambios citopáticos de morfología de queratinocitos y estructurales, en capa basal con mitosis atípicas y otras características de displasia epitelial según OMS en una de las capas epiteliales.

D. Cambios citopáticos de morfología de queratinocitos y estructurales con mitosis atípicas y otras características de displasia epitelial según OMS en dos o más capas epiteliales

Otras características evaluadas fueron:

- Presencia de coilocitos,
- Distribución de coilocitos
- Alteración célula coilocítica
- Presencia de queratina
- Tipo de queratina
- Displasia epitelial
- Infiltrado inflamatorio
- Membrana basal
- Hiperplasia epitelial

5.7 DETERMINACION DEL ADN DEL VPH DE LAS MUESTRAS

5.7.1. Extracción de ADN de las muestras de hisopado mucosa oral sana. La extracción del ADN de mucosa bucal se realizó teniendo en cuenta el protocolo empleado por *Aidar y Line* (2007)(77) modificado por *Mancilla* 2012(6). POE 002. Cada hisopo se colocó de manera inmediata en un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 0,5 ml solución de lisis TNS conformada por, Tris HCl 10 mM (Trisma-ácido clorhídrico) y NaCl 5M (Cloruro de Sodio), SDS 0,5% (Dodecilsulfato sódico). Se almacenaron a 4°C por una semana. Para obtener el ADN libre de los núcleos, se adicionaron 10µl de Proteínasa K (*Invitrogen*TM), a una concentración

final de 20 mg/ml, a 56°C por 12 horas (baño María marca Eyela®). Para detener esta reacción, se desnaturalizó la PK a 95°C por 10 minutos. Posteriormente se precipitaron los residuos de proteína con 300 µl de la solución de acetato de amonio (AcNH₄) 8M/EDTA 1mM). Se dejaron por 10 minutos a 4 °C. Se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo nuevo Eppendorf para centrifugarse a 13000 RPM durante 10 minutos. El ADN se precipitó con un volumen igual de isopropanol absoluto frío. Se almacenaron los eppendorf previamente rotulados a -20°C por 12 horas (Congelador Whirlpool). Para recolectar el pellet con ADN se centrifugaron los tubos a 13000 RPM por 10 minutos en frío. El pellet se sometió luego a un último lavado con 200 µL de etanol frío al 70%. Los tubos invertidos se dejaron secar a temperatura ambiente. Para solubilizar el ADN y su posterior almacenamiento a 4°C, se añadieron 100 µL de TE (Trisma 10 mM- EDTA 1mM).

5.7.2 Extracción de ADN de biopsias

5.7.2.1 Cortes de tejido de las biopsias parafinadas. Se realizaron de 3 a 5 cortes de 5µm de espesor (con área de superficie de la muestra de 10 x 12 mm) a cada uno de las 198 biopsias parafinadas empleando el micrótopo (Spencer 820™), con un ángulo de inclinación de 35 grados para obtener mayor cantidad de tejido. Para evitar contaminación se usó una cuchilla de alto perfil (Macrosearch), por cada bloque parafinado previa limpieza del micrótopo con etanol 100% (78). Los cortes obtenidos se almacenaron a temperatura ambiente en un tubo *Eppendorf* estéril de 1,5 ml con su CUP respectivo.

5.7.2.2 Desparafinación de las biopsias de cavidad bucal. Según el método de desparafinación publicado en *Mancilla et al, (2012)* (64), se construyó el POE 3 en breve el protocolo se describe como sigue: Se adicionaron 800µl de xilol a cada tubo Eppendorf con los cortes de tejido. Se mezclaron por inversión suavemente durante 5 minutos. Luego se añadieron 400µl de etanol absoluto a temperatura

ambiente por 1 minuto. Se mezclaron por inversión. Posteriormente se centrifugaron los tubos por 2 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente (Fisher Scientific®). Se descartó el sobrenadante y para eliminar el xilol residual, y se procedió al lavado con 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente, a 13.000 rpm por 2 minutos. Finalmente se incubaron los tubos a 55°C durante 20 minutos (baño María marca Eyela®), hasta obtener el tejido desparafinado.

5.7.2.3 Extracción de ADN de tejido desparafinado. Mediante el método descrito por *Chan et al* (2001) (78) modificado por *Mancilla et al* (2011)(64), se escribió el POE 3 para extraer ADN de tejido. Dependiendo de la cantidad de tejido, se adicionaron al tejido desparafinado entre 200 y 300 µl de buffer de digestión (Tris-HCl 0.1M, pH 7.4; Tween 20 0,4% y EDTA 10mM).

Se adicionaron 5 µl de la enzima Proteinasa K o PK (*Invitrogen*™), a una concentración final de 0.5 mg/ml. Se mezcló en vortex (Genie 2®) por 5 segundos. Se incubó a 56°C durante 12 horas (digestión durante la noche), con agitación constante. Posteriormente la PK se inactivó a 95°C durante 10 min (baño María marca Eyela®). Se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante, se transfirió a un nuevo tubo con su respectivo CUP. El sobrenadante obtenido se refrigeró a 4°C. Luego cada muestra se precipitó por adición de NaCl 3M, 2/3 del volumen por 3 horas. Se centrifugaron los tubos por 20 min a 13000 rpm. El sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo Eppendorf y. Se añadió un volumen de isopropanol (SIGMA-ALDRICH). Se refrigeraron las muestras por 12 horas. Se centrifugaron por 30 min a 14.000 rpm. El sobrenadante se descarta y el pellet obtenido se lavó con 200mL etanol al 70% por 3 min a 14.000 rpm. Se dejaron secar los tubos invertidos completamente. Para su almacenamiento se agregaron 100 uL a cada tubo solución tampón TE (Tris HCl 10mM y EDTA 0,5 mM) (SIGMA-ALDRICH). Para aumentar la solubilidad del ADN, se incubó a 37°C por 10 min. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta la realización de las pruebas moleculares.

5.7.3 Determinación de la calidad y cantidad del ADN extraído por la amplificación del Gen β -globina humano. La amplificación de un fragmento del gen de β -globina, se emplea como un control interno de la calidad y cantidad de las muestras de ADN obtenidas, siendo este un gen de copia única en el genoma nuclear y considerando que un individuo normal presenta dos copias correctas de este gen su amplificación ha sido estandarizada para cantidades muy bajas de ADN en condiciones estándares de PCR. La positiva amplificación de este gen permite establecer la adecuada calidad y cantidad de las muestras de ADN estudiadas.

La calidad y cantidad del ADN extraído se verificaron a través de la amplificación de un fragmento del gen β -globina, empleando el protocolo reportado por Saiki, 1985 (79) utilizando los cebadores PC04 y GH20 para las muestras de mucosa sana de cavidad oral o y pc04 pc03 para lesiones orales y carcinoma oral. La secuencia de los primers se muestra en la tabla 7 y el protocolo descrito en la tabla 8.

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos cebadores y tamaño de los productos amplificados, utilizados en la amplificación del gen β -globina

Gen	Cebador	Secuencia (5'→ 3') Forward/ Reverso	Tamaño del producto (pb)	Bibliografía
β -Globina	PC04 GH20	CAACTTCATCCACGTTCCACC- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-	268	<i>R K. Saiki⁸⁹ Et al.,1985</i>
β -Globina	PC03 PC04	-ACACAACTGTGTTCACTAGC- "CAACTTCATCCACGTTCCACC-	110	<i>R K. Saiki Et al.,1985</i>

Tabla 8. Protocolo de amplificación del gen β -globina PC04-GH20 y PC04-PC03 para muestras de Mucosa oral y Biopsias orales

Reactivos	Concentración	1Rx	Reactivos	Concentración	1Rx
H ₂ O destil		5,31 μ L	H ₂ O destil		6,6 μ L
Buffer Taq 5X	1X	2,5 μ L	Buffer Taq 5x	1X	1,25 μ L
MgCl ₂ 25mM	[1,5 mM]	0.75 μ L	MgCl ₂ 25mM	1,5 mM	0.75 μ L
dNTPs 5mM	0,2mM	0,5 μ L	dNTPs 5mM	0,2mM	0,5 μ L
PC Φ 4 10 μ M	0,5 μ M	0,62 μ L	PC Φ 4 10 μ M	0,5 μ M	0,625 μ L
PC Φ 3 10 μ M	0,5 μ M	0,62 μ L	GH20 10 μ M	0,5 μ M	0,625 μ L
Taq 5u/ μ L	0.5u	0,2 μ L	Taq 5u/ μ L	0.5u	0,2 μ L
DNA		2 μ L	DNA		2 μ L
Vol. total		12,5 μ L	Vol. total		12,5 μ L

Rx= reacción

5.7.4 Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) para amplificación de β -globina. Una vez obtenido el ADN celular, se determinó la concentración y pureza del material mediante el espectrofotómetro Nanodrop(80) (Thermo Scientific. Nanodrop products), teniendo en cuenta que la calidad óptima se determina con la relación de las absorbancias a 260 y 280 (260/280) mayor de 1.8 hasta 2.0.

La amplificación, se realizó en un volumen final de 12,5 μ L de mezcla de reacción que incluyo los siguientes reactivos: Solución tampón Taq 1x (100 mM tris-HCl, pH entre 8 y 9), MgCl₂ 25mM, 0.2 mM dNTPs, 10 pmol de cada uno de los cebadores. Se empleó Taq polimerasa 5u/ μ L (0,25 unidades por reacción) (marca Promega) para 2 μ L de ADN. Ver Tabla 7 y 8. Como control positivo para el fragmento del gen de β -globina se empleó ADN extraído de linfocitos humanos. Como control negativo se usó mezcla de reacción en ausencia de ADN. La amplificación se realizó en un Termociclador (Berchman) con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos, cada ciclo incluyó los siguientes pasos: 90°C por un minuto, 58°C por 30 segundos, y 72°C

por 30 segundos. Se adicionó un último paso de extensión a 72°C por 10 minutos para completar los fragmentos. Todas las ampliaciones o productos de PCR se verificaron en gel de agarosa (Sea Kim, FMC Bioloabs) al 2%, teñido con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a una concentración de 0,5 µg/ml, en una cámara de electroforesis horizontal (*Fotodyne Inc., Hartland, WI, Estados Unidos*). Los geles se corrieron a 100 voltios (80 mAmp) durante 20 a 30 min (Thermo Fisher Scientific Inc., Asheville, Carolina del Norte, Estados Unidos).

5.7.5. Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR) para amplificación del gen E7 de VPH-16. Para establecer las condiciones óptimas de la amplificación del gen E7 de VPH por PCR, se realizó la estandarización de las pruebas de PCR, con dos pruebas pilotos utilizando 16 y 30 muestras de ADN cuantificadas previamente por espectrofotometría a 260nm (Nanodrop Thermo Scientific). La estandarización permitió comparar los datos entre equipos y operarios diferentes. Es decir se realizó análisis de la repetibilidad y exactitud de la prueba Intraobservador interobservador.

Según protocolo empleado por *Mancilla et al* (2012) (64), se realizó una mezcla de reacción similar a la descrita anteriormente para la amplificación del gen de β -globina, salvo que se utilizaron los cebadores específicos para el gen E7 del VPH tipo 16 relacionados en la tabla 9. VPH16F y VPH16R: VPH16FN1 CATGGAGATACACCTACATTG/ VPH-16RN CAGATGGGG CACACAATTCC, para muestras de mucosa oral sana (ver Tabla 10 A) y New TS16F GGTCCGGTGGACCGGTCGATG New TS26R GCAATGTAGGTGTATCTCCA (New TS16F y New TS16F) (*M.F Baay* 1996)(81) para las muestras de biopsias parafinadas (Tabla 10B). La determinación del gen viral se realizó usando el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos con el siguiente programa: 94 °C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72 °C por un minuto. Extensión final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente se verificaron los productos de la PCR mediante separación por

electroforesis con gel de agarosa al 2% y 2,5% y posterior observación de la fluorescencia con bromuro de etidio (marca Reach organics) bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Se hizo registro fotográfico (cámara polaroid con filtro de luz UV) posteriormente. Ver POE4.

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos cebadores y tamaño de los productos amplificados, utilizados en la amplificación del gen *E7* del VPH16

Gen	Cebador	Secuencia (5'→ 3') Forward/ Reverso	Tamaño del producto (pb)	Bibliografía
E7 HPV16	HPV16FN1 HPV16RN	CATGGAGATACACCTACATTG/ CAGATGGGGGCACACAATTCC	277	Gheit et al.,2006
E7 HPV16	New TS16F New TS26R	GGTCGGTGGACCGGTCGATG GCAATGTAGGTGTATCTCCA	96	M.F. Baay ⁹¹ et al.,1996

Tabla 10. Protocolo de amplificación del gen *E7* de VPH16 de muestras de mucosa oral sana y de biopsias orales.

10A

Reactivos	Concentración	1Rx
Buffer Taq 5x	1X	2,5 µL
MgCl ₂ 25mM	[2 mM]	1 µL
dNTPs 10mM	0,2mM	0,5 µL
VPH16R 10µM	0,5µM	0,5 µL
VPH16F 10µM	0,5µM	0,5 µL
Taq 5u/µL	1-2,5u	0,125 µL
H ₂ O destil		5,375 µL
DNA		2 µL
Vol. total		12,5 µL

10B

Reactivos	Concentración	1Rx
H ₂ O destil		7,05 µL
Buffer Taq 10X	1X	1,25 µL
MgCl ₂ 25mM	[2 mM]	1 µL
dNTPs 5mM	0,2mM	0,5 µL
VPHVPH New TS16F 10µM	0,2 µM	0,25 µL
VPHVPH New TS16R 10µM	0,2µM	0,25 µL
Taq 5u/µL	0.5u	0,2 µL
DNA	50-100ng	2,0 µL
Vol. total		12,5 µL

5.7.6 Control positivo. La línea de células Caski es un grupo aislado de carcinomas uterinos los cuales presentan integrado el VPH en especial el tipo 16. Por hibridación in situ han detectado hasta 600 copias del virus por célula. (82).

Este estudio empleó como control positivo, DNA extraído de células Caski cultivadas en el Departamento de fisiología de la Universidad del Valle.

5.8 ANÁLISIS ESTADISTICO

5.8.1. Elaboración de la base de datos. Con los resultados moleculares generados en muestras de mucosa oral, se realizó análisis que incluyeron la población general, las muestras aptas valoradas con β -globina y las muestras VPH positivas, los datos que se tuvieron en cuenta incluyen los sociodemográficos, los de comportamiento social y sexual (ver encuesta). Después de realizar dos evaluaciones a cada muestra, los resultados de la evaluación patológica de las placas histológicas, se consignaron en la base de datos, en el programa Excel para Windows® 2007. Para la caracterización demográfica del material parafinado se tuvieron en cuenta los siguientes datos: diagnóstico, edad, género, ubicación topográfica en la cavidad oral y año de realización de biopsias.

Los parámetros histopatológicos evaluados fueron presencia de coilocitos, distribución de coilocitos, alteración célula coilocítica, presencia de queratina, tipo de queratina, displasia epitelial, infiltrado inflamatorio, membrana basal, hiperplasia epitelial. La base de datos se realizó, a partir de los datos reportados de cada una de las placas histológicas.

Los datos que se archivaron en *Excel® de Microsoft®*, fueron analizados en STATA 12.0 con una significancia del 5% sobre las pruebas estadísticas utilizadas. Se hizo análisis univariado; se describieron como promedios y las categóricas como proporciones. Las variables discretas se expresaron en frecuencias y proporciones y las variables continuas con la media $\pm$ desviación estándar.

Para analizar a indicadores descriptivos como aspectos sociodemográficos se hicieron frecuencias absolutas y relativas en términos, distribución del diagnóstico, resultado de VPH y lesiones verrugosas. Posteriormente se realizó un análisis bivariado, y se implementó la prueba exacta de Fisher (fue excluida la frecuencia observada de la categoría sin dato) para evaluar la asociación entre aspectos demográficos, aspectos del diagnóstico y lesiones verrugosas versus resultados obtenidos de VPH.

5.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio cumplió con todas las normas éticas dadas por la Declaración de Helsinki 2008, Las normas Bioéticas de la investigación, las Pautas Éticas Internacionales para la investigación Biomédica en Seres humanos – CIOMS y la Resolución 008430 de 1993 – Ministerio de Salud Guía de las buenas prácticas Clínicas y Normas éticas de la profesión de Odontología.

Para la realización de la toma de muestras por medio de hisopados en mucosa sana los participantes firmaron el consentimiento informado de manera voluntaria y con conocimiento previo de los objetivos y procedimientos relacionados con el estudio. Anexo #10

Para el manejo de los bloques parafinados provenientes de la consulta particular se tuvo certificado de idoneidad de los resultados y aceptación para el estudio por parte del Dr. Carlos Emiro Tasamá.

Este estudio contó con la aprobación de los siguientes comités Comité de Ética de la Universidad del Valle acta No. 07-014 del 08-07- 2014 y Comité de Ética del Hospital Universitario del Valle acta No. 001- 2014 abril 2014 Comité de Ética de la Universidad Santiago de Cali acta No. 02 del 21-03-2014. Ver anexos # 5, 6, 7, 8,

6. RESULTADOS

Este estudio se realizó con 268 muestras de mucosa oral distribuidas así: 70 muestras de hisopado de mucosa sana procedentes de igual número de participantes voluntarios y 198 biopsias parafinadas procedentes de lesiones de cavidad oral y carcinoma escamocelular, como se refirió en la metodología. De las 70 muestras de mucosa oral sana se excluyeron 5, un participante por datos insuficientes y cuatro por ADN degradado, quedando finalmente un número de 65. Las muestras parafinadas fueron procesadas en su totalidad.

6.1 CARACTERIZACION DE LA POBLACION DE ESTUDIO

6.1.1 Factores sociodemográficos en participantes con mucosa sana. El grupo de participantes que aportaron las muestras de mucosa oral sana en el estudio, presentó un rango de edad entre 18 y 25 años. El 66.7 % de los participantes en este grupo era mujeres (46/69), un 47,8% tenía un nivel de escolaridad universitario (33/69), la mayoría se reconoció como de etnia mestiza 39.1% (27/69), seguido de blancos 29.9% (20/69). Un 59.4% eran solteros (41/69), el 43.5% de los participantes tenía un promedio de ingresos hasta un salario mínimo (40/69). Las características sociodemográficas de este grupo se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Caracterización demográfica y de los factores de riesgo de la infección de mucosa oral

Variable	Hombres	Mujeres	Total 69
	23 (33.3%)	46 (66.7%)	69 (100.0%)
Rango de edad			
18-25	13 (56.5%)	28 (60.8%)	41 (59.4%)
25-40	2 (8.7%)	3 (6.5%)	5 (7.2%)
>40	8 (34.8%)	15 (32.6%)	23 (33.3%)
Nivel de escolaridad			
Primaria	3 (13%)	4 (8.7%)	7 (10.1%)
Secundaria	7 (30.4%)	11 (23.9%)	18 (26.1%)
Técnica	0 (0.0%)	5 (10.8%)	5 (7.2%)
Universitaria	11 (47.8%)	22 (47.8%)	33 (47.8%)
Sin estudios	1 (4.3%)	1 (2.2%)	2 (2.9%)
Sin dato	1 (4.3%)	3 (6.5%)	4 (5.8%)
Grupo étnico			
Blanco	8 (34.8%)	12 (26.1%)	20 (29.9%)
Indio	4 (17.4%)	6 (13.0%)	10 (14.5%)
Mestizo	6 (26.1%)	21 (45.6%)	27 (39.1%)
Afrodescendiente	0 (0.0%)	3 (6.5%)	3 (4.3%)
Otro	0 (0.0%)	1 (2.2%)	1 (1.4%)
Sin dato	5 (21.7%)	3 (6.5%)	8 (11.6%)
Estado civil			
Casado	3 (13.0%)	5 (10.8%)	8 (11.6%)
Soltero	16 (69.6%)	25 (54.3%)	41 (59.4%)
Unión libre	3 (13.0%)	10 (21.7%)	13 (18.8%)
Separado	1 (4.4%)	3 (6.5%)	4 (5.8%)
Sin dato	0 (0.0%)	3 (6.5%)	3 (4.3%)
Promedio de ingresos			
Hasta 1 salario mínimo	9 (39.1%)	21 (45.6%)	30 (43.5%)
De 2-3 salarios	3 (13.0%)	9 (19.6%)	12 (17.4%)
Más de 3 salarios	2 (8.7%)	8 (17.4%)	10 (14.5%)
Sin dato	9 (39.1%)	8 (17.4%)	17 (24.6%)

6.1.2 Caracterización patológica y sociodemográfica de las lesiones orales.

Para facilitar el análisis los diagnósticos histopatológicos de las lesiones orales se reordenaron en grupos con características similares así: Papilomas, Condilomas, Hiperqueratosis, Hiperplasias Epiteliales y Carcinomas escamocelulares. En el grupo de las Hiperplasias epiteliales, se incluyeron las hiperplasias epiteliales con hiperqueratosis, hiperplasia con displasia leve o moderada y pseudoepiteliomatosa.

En la Tabla 12 se muestra la distribución por género y grupo de edad de las diferentes lesiones caracterizadas; se destaca en la población objeto de estudio que la mayoría perteneció al género femenino (58.1%) y un mayor porcentaje de muestras en el grupo con rango de edad entre 51-70 años (37.9%).

Tabla 12. Características demográficas de las lesiones orales.

Variable	n	Porcentaje
Género		
Femenino	115	58.1
Masculino	83	41.9
Grupo de edad		
11 - 30	35	17.7
31-50	42	21.2
51- 70	75	37.9
> 70	40	20.2
Sin dato	6	3.0
Total	198	100

6.1.3 Distribución de las lesiones orales según diagnóstico y topografía. La distribución de las lesiones de acuerdo a su diagnóstico, se presenta en la tabla 13 y se resume como sigue: Condilomas 10/198 (5.1%), Papilomas 49/198(24.8%), Hiperplasias, 67/198 (33.8%) Hiperqueratosis 4/198(2.0%), Liquen Plano 2/198(1.0%) y Carcinoma Escamocelular 66/198(33.3%). Las lesiones con diagnósticos de Hiperplasias y Carcinomas Escamo celulares fueron los más frecuentes, con el 33.8% y 33.3% respectivamente. En cuanto a la topografía, la

zona de mayor manifestación de lesiones corresponde a la lengua con 25.3% (50/198), seguido de áreas del paladar que representaron el 18.2% (36/198) y en carrillo con el 15.2%, (30/198).

Tabla 13. Distribución de las lesiones orales según diagnóstico y Topografía

Variable	n	%
Grupo diagnóstico		
Condiloma	10	5.1
Papiloma	49	24.8
Hiperplasia	67	33.8
Hiperqueratosis	4	2.0
Liquen plano	2	1.0
Carcinoma escamocelular	66	33.3
Topografía		
Lengua	50	25.3
Labio inferior	17	8.6
Paladar	36	18.2
Carillo	30	15.2
Reborde alveolar superior	19	9.6
Zona retromolar inferior	6	3.0
Frenillo labial superior	6	3.0
Otros (amígdala-orofaringe-encía, labio superior)	33	16.7
Labio externo	1	0.5
Total	198	100

6.1.4 Distribución topográfica de acuerdo al tipo de lesión. Con relación a la distribución topográfica de las lesiones orales totales, se observó que el condiloma predominó en lengua en 5 de 10 lesiones (50%). Las lesiones con diagnóstico de Papiloma se detectó en todas las regiones la cavidad oral distribuidas en su mayoría así: el paladar con 14 de 49 lesiones (28.6%), 9 en zona de carrillo (18.4%), 8 en lengua (16.3%) y en labio se presentaron 5 lesiones (10.2%). Las hiperplasias se presentaron en las zonas de alta fricción como carrillos con 15 de 67 lesiones (22.4%), en reborde alveolar superior 14 (20.9%) y lengua en 13 lesiones (19.4%). El diagnóstico de Hiperqueratosis, se presentó en el reborde alveolar superior 3 de 4 lesiones (75.0%). El Liquen Plano apareció en paladar y la zona posterior (AOE) en igual frecuencia. Finalmente el Carcinoma Escamo celular se diagnosticó principalmente en la lengua 24 ¿?(36.4%) en orofaringe 18 ¿?(27.3%) y paladar (21.2%). La distribución de las lesiones de acuerdo a su topografía se muestra en la Tabla 14 (Análisis bivariado).

Tabla 14. Distribución topográfica de las lesiones orales.

Grupo diagnóstico	Topografía									Total
	Lengua	Labio I.	Paladar	Carrillo	R.A.S	Z. R.I	FLS	AOE	Labio S.	
Condiloma	5 (50.0%)	2 (20.0%)	1 (10.0%)	2 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (100.0%)
Papiloma	8 (16.3%)	5 (10.2%)	14(28.6%)	9 (18.4%)	1 (2.0%)	2 (4.1%)	2 (4.1%)	7 (14.3%)	1 (2.0%)	49 (100.0%)
Hiperplasia	13 (19.4%)	6 (8.9%)	6 (8.9%)	15 (22.4%)	14 (20.9%)	2 (2.9%)	4 (5.9%)	7 (10.45%)	0 (0.0%)	67 (100.0%)
Hiperqueratosis	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3(75.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (100.0%)
Liquen plano	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (50.05)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (50.05)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
Carcinoma Escamocelular	24 (36.4%)	4 (6.1%)	14(21.2%)	4 (6.1%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)	18 (27.3%)	0 (0.0%)	66 (100.0%)
Total	50 (25.25%)	17 (8.6%)	36 (18.2%)	30 (15.1%)	19 (9.6%)	6 (3.0%)	6 (3.0%)	33 (16.7%)	1 (0.5%)	198 (100.0%)

Labio I: labio inferior. Labio S: Labio Superior RAS: Reborde alveolar superior ZRI: Zona Retromolar Inferior AOE: Amígdala-Orofaringe-Encía

6.2 EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN

Mediante protocolos de *Aidar y Line 2007*, modificado por *Mancilla y col 2012*, para muestras de mucosa sana y protocolo de *Chan et al 2001* modificado por *Mancilla y et al 2011*, para biopsias parafinadas, se obtuvo ADN en el 98.50% de las muestras orales (263/267). En el grupo de mucosa sana se obtuvo ADN en el 94.20% de las muestras (65/69), y en el grupo de las biopsias parafinadas se obtuvo ADN en la totalidad de las muestras (100%) (198/198). El fragmento del gen β -globina fue amplificado en 155 muestras de ADN (155/264), lo que corresponde al 58.93%. Con respecto al grupo de mucosa sana, 49 muestras de un total de 65 presentaron amplificación del gen de β globina (75.38%) utilizando los cebadores específicos, los cuales amplificaron un fragmento de 268 pb y cebadores que amplificaron un fragmento de 110 pb. Además se amplificó el fragmento de 110 pb para biopsias orales y carcinomas escamocelulares de las cuales se obtuvo 106 muestras de un total de 198 distribuidos así: Lesiones benignas 62 muestras: correspondiendo a un 41% de lesiones con diagnóstico de Papilomas (26/62), 11.2% para lesiones con Condilomas (7/62), 43.5% de Hiperplasias Epiteliales (27/62) y de Hiperqueratosis 3.2% (2/62); lesiones premalignas 5 muestras: Una leucoplasia verrugosa proliferativa correspondiendo al 20% (1/5) una hiperplasia con displasia epitelial con un 20 % (1/5) y un liquen plano con un 20% (1/5) ; lesiones con diagnóstico de carcinoma escamo celular un 36.79% (39/106) Ver tabla 21

En las figuras 13 y 14 se muestra el producto de la PCR, que fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% (muestras de β globina) teñido con bromuro etidio.

Figura 13. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de β -globina. Carril N control Negativo Carril 2 a 10 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 12 control positivo (linfocitos), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder. Thermofisher).

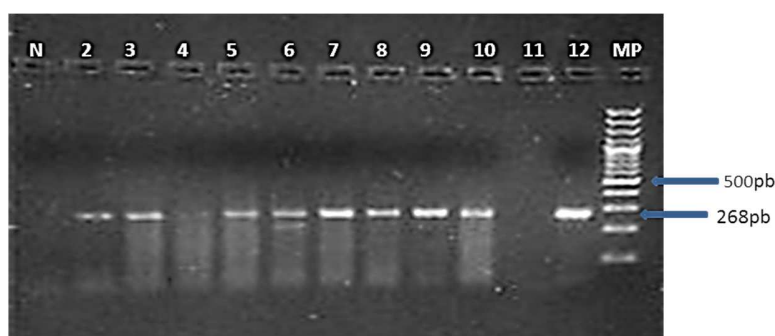
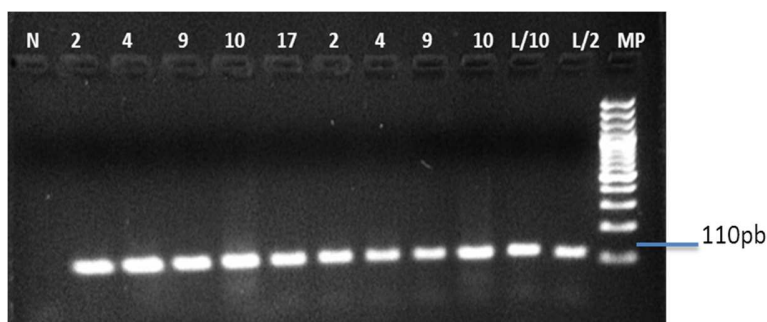


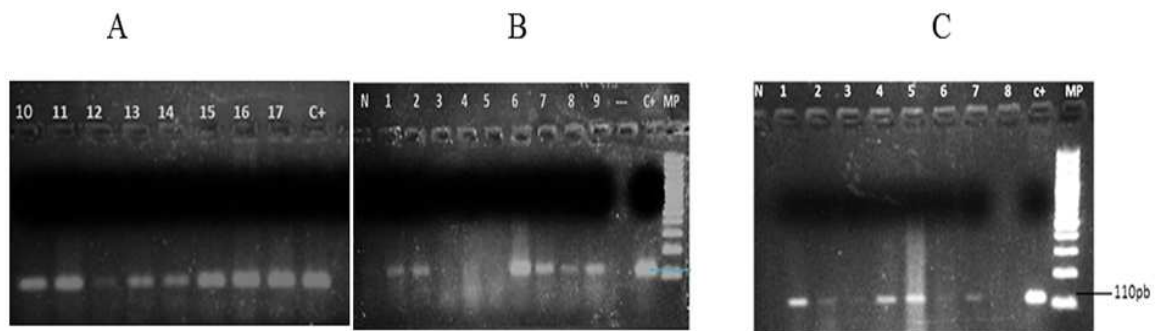
Figura 14. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 110 pb del gen de β -globina. Carril N control Negativo, Carril 2 a 10 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 11 y 12 control positivos (linfocitos), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder. Thermofisher).



Se encontró amplificación del fragmento de 110 pb del gen de beta-globina en 106 de las 198 biopsias parafinadas de lesiones orales, (53.53%). Las muestras positivas para esta prueba fueron evaluadas para determinar la presencia del gen E7 de VPH16.

En la figura 15 se visualiza el producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2% (muestras de β globina) correspondiente a las lesiones orales, teñidas con Bromuro etidio.

Figura 15. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 110 pb del gen de β -globina. Control Negativo (N), Carril 1, 2,6-9,10-17 amplicones obtenidos a partir de biopsias oral, carril 11 y 18 controles positivos (linfocitos), MP con peso molecular 100 pb (DNA Ladder. Thermofisher). El control Negativo (N), ADN de biopsias orales desde el carril 1 al 8.



La tabla 15 muestra la relación de resultados generales que incluyen total de extracciones de ADN, muestras con β -globina positivas y muestras VPH positivos además de la frecuencia relativa con relación a resultados VPH de cavidad oral correspondiendo a 35 muestras para un total de 22.58% en este estudio.

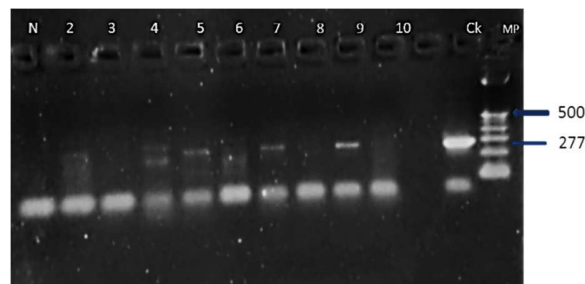
Tabla 15. Relación de resultados generales de extracción de ADN, muestras con β -globina positivas y muestras VPH positivos, de hisopado de mucosa oral y biopsia de lesiones orales.

Muestras orales	N	Histopatología H& E	Pruebas Moleculares		
			Extracción ADN	PCR β globina	PCR VPH+
Mucosa Sana	69	NA	65 (94.20%)	49 (75.38%)	22 (44.89%)
Biopsias	198	198	198 (100%)	106 (53.53%)	13 (12,27%)
Total	267	198	263 (98.50%)	155(58.93%)	22.58%

6.3 FRECUENCIA DE VPH16 E7 EN MUESTRAS ORALES

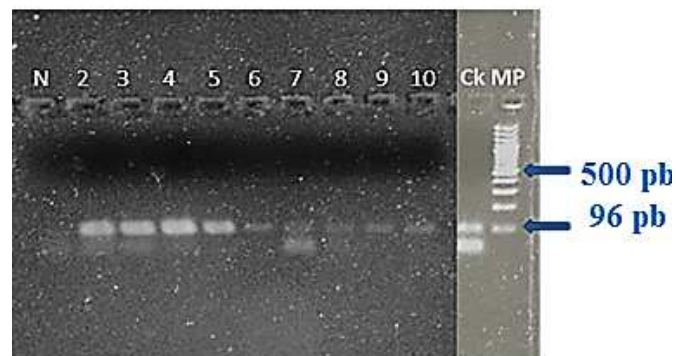
6.3.1 Frecuencia de VPH16 E7 en muestras de mucosa oral sana. Para la detección del ADN de VPH16 se realizó el ensayo de amplificación del gen *E7* mediante la técnica de PCR, en las 49 muestras positivas PARA el PCR de β -globina. En total 22 de 49 muestras (44,89%) amplificaron un fragmento de 277 pb correspondiente al gen E7 viral (ver tabla 15). En la figura 16 se observa muestras representativas con productos de PCR, en electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Figura 16. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 277 pb del gen de *E7 VPH16*. Carril N control Negativo Carril 2 ,4, 5, 7, 9 muestras amplificadas de mucosa oral, carril 12 control positivos (DNA Caski), carril 13 patrón de peso molecular (ADN Ladder.Thermofisher). Agarosa al 2%.



Se realizó adicionalmente amplificación de un fragmento de 96 pb del gen E7 viral en las muestras de mucosa oral; los productos de PCR se pueden observar en la figura 17, por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y teñido con bromuro de etidio.

Figura 17. Amplificación representativa de productos obtenidos por PCR de un fragmento de 96 pb del gen de *VPHE7*. Carril N control Negativo, Carril 2 ,4 ,5, 7, 9 muestras amplificadas de mucosa oral de participantes del estudio, carril 12 control positivos (DNA Caski), carril 13 patrón de peso molecular (DNA Ladder. Thermofisher).



Este grupo de muestras VPH16 positivos, fué empleado para el análisis de asociación entre los datos estadísticos sociodemográficos y los factores de riesgo de infección por VPH en mucosa oral.

6.3.2 Factores sociodemográficos de población VPH positivos de mucosa oral sana. Como se muestra en la tabla 16, se encontró que en el grupo con la presencia de VPH 16 el 72.7% (16/22) pertenecía al género femenino, la población con la infección fue un grupo joven con edad que predominó entre 18 y 25 años con 72.7% (16/22), la mayoría perteneciente a raza mestiza con 40.9% (9/22) y universitarios 63.6% (14/22). El Estado civil más frecuente fue soltero con un 68.2% (15/22). Ninguna variable sociodemográfica tuvo asociación significativa con la infección de VPH.

Tabla 16. Factores sociodemográficos de población VPH positivos de Mucosa oral

	Con VPH (22)	Sin VPH (43)	Total (65)	Valor - p
Sexo				
Masculino	6 (27.3)	16 (37.2)	22 (33.8)	0.581
Femenino	16 (72.7)	27 (62.8)	43 (66.1)	
Grupo de edad				
18-25	16 (72.7)	24 (55.8)	40 (61.5)	0.197
25-40	2 (9.1)	2 (4.6)	4 (6.1)	
>40	4 (18.2)	17 (39.5)	21 (32.3)	
Nivel de escolaridad				
Primaria	1 (4.5)	6 (13.9)	7 (10.8)	0.577
Secundaria	4 (18.2)	12 (27.9)	16 (24.6)	
Técnica	2 (9.1)	3 (6.9)	5 (7.7)	
Universitaria	14 (63.6)	18 (41.9)	32 (49.2)	
Sin estudios	0 (0.0)	2 (4.6)	2 (3.1)	
Grupo étnico				
Blanco	7 (31.8)	10 (23.3)	17 (26.1)	0.872
Indio	4 (18.2)	6 (13.9)	10 (15.4)	
Mestizo	9 (40.9)	18 (41.9)	27 (41.5)	
Afrodecendiente	1 (4.5)	2 (4.6)	3 (4.6)	
Otro	0 (0.0)	1 (2.3)	1 (1.5)	
Estado civil				
Casado	2 (9.1)	6 (13.9)	8 (12.3)	0.716
Soltero	15 (68.2)	24 (55.8)	39 (60.0)	
Unión libre	3 (13.6)	8 (18.6)	11 (16.9)	
Separado	2 (9.1)	2 (4.6)	4 (6.15)	
Promedio de ingresos				
Hasta 1 salario mínimo	6 (27.3)	22 (51.2)	28 (43.1)	0.226
De 2-3 salarios	4 (18.2)	8 (18.6)	12 (18.5)	
Más de 3 salarios	5 (22.7)	5 (11.6)	10 (15.4)	

6.3.3 Factores de comportamiento social y sexual asociados a la Infección por VPH16 en participantes con mucosa sana. En la tabla 17 se muestra el análisis acerca de los hábitos relacionados con la infección por VPH, en donde se encontró que la mayoría de los individuos con diagnóstico de VPH16 en este estudio, consumía bebidas alcohólicas ocasionalmente (63.6%), no fumaba (63.6%) y del grupo de individuos con antecedentes de fumadores el 22.7% había dejado de fumar hacía más de 3 años.

Tabla 17. Factores de riesgo del estilo de vida para la infección en Mucosa oral sana.

Variable	Con VPH (n=22)	Sin VPH (n=27)	Total (n=49)	P
Consumo de bebidas alcohólicas				
Nunca	3 (13.6%)	2 (7.4%)	5 (10.2%)	0.234
Ocasional	14 (63.6%)	21 (77.8%)	35 (71.4%)	
Fin de semana	2 (9.1%)	4 (14.8%)	6 (12.2%)	
Relativa frecuencia	3 (13.6%)	0 (0.0%)	3 (6.1%)	
Consumo de tabaco				
Si	8 (36.4%)	11 (40.7%)	19 (38.8%)	0.874
No	14 (63.6%)	15 (55.6%)	29 (59.2%)	
Sin dato	0 (0.0%)	1 (3.7%)	1 (2.0%)	
Hace cuánto tiempo fuma				
No fuma	14 (63.6%)	15 (55.6%)	29 (59.2%)	0.097
Menos de 1 año	0 (0.0%)	5 (18.5%)	5 (10.2%)	
De 1 a 3 años	2 (9.1%)	0 (0.0%)	2 (4.1%)	
Más de 3 años	5 (22.7%)	4 (14.8%)	9 (18.4%)	
Sin dato	1 (4.5%)	3 (11.1%)	4 (8.2%)	

Con respecto al comportamiento sexual, el 95.5% al momento del estudio acepto haber tenido relaciones sexuales (21/22); había iniciado su vida sexual el 75% (15/22); su primera relación sexual se inició entre los 15 y 18 de edad; eran

sexualmente activos el 68.2%(15/22) , el 68.4% manifestó realizar la práctica de sexo oral (16/22) y más de la mitad (63.6%) habían tenido solo un compañero sexual.

Con relación a los antecedentes gineco-obstétricos la mayoría no tenían hijos (69.2%). El análisis de correlación entre la presencia de VPH16 y los diferentes factores, mostró que sólo se presentó asociación significativa entre la práctica de sexo oral y la infección por VPH ($p=0.04$) con un OR de 0.581, esto indica que los participantes que practican sexo oral en este grupo de estudio, presentaron más posibilidad de tener VPH que los participantes que no lo practican, como se observa en la Tabla18.

Tabla 18. Factores de riesgo del comportamiento sexual para la infección por VPH.

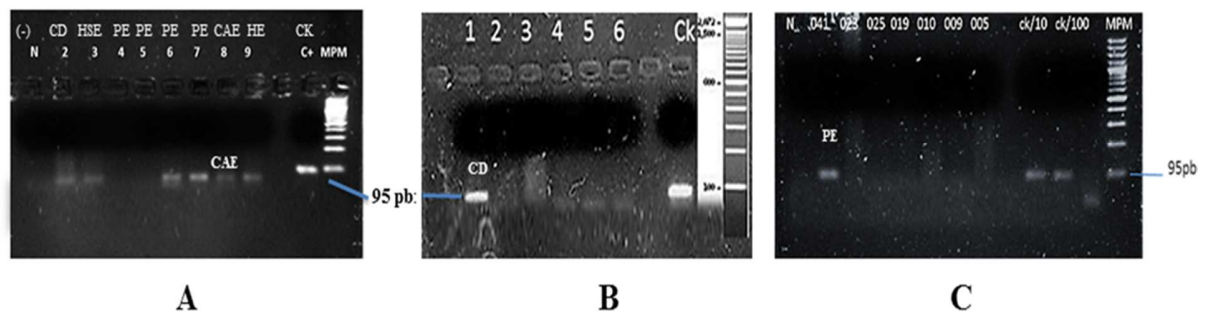
Variable	Con VPH (n=22)	Sin VPH (n=27)	Total (n=49)	P
Ha tenido relaciones sexuales				
Si	21 (95.5%)	25 (92.6%)	46 (93.8%)	1.000
No	1 (4.5%)	2 (7.4%)	3 (6.1%)	
Edad de la primera relación sexual				
>18	4 (20.0%)	1 (4.2%)	5 (11.4%)	0.259
15 – 18	15 (75%)	21 (87.5%)	36 (81.8%)	
<15	1 (5%)	2 (8.3%)	3 (6.8%)	
Vida sexual activa				
Si	15 (68.2%)	23 (85.2%)	38 (77.5%)	0.263
No	6 (27.3%)	3 (11.1%)	9 (18.4%)	
Compañeros sexuales				
Solo uno	14 (63.6%)	15 (60.0%)	29 (61.7%)	0.768
<3	4 (18.2%)	7 (28%)	11 (23.4%)	
>3	4 (18.2%)	3 (12%)	7 (14.9%)	
Hijos vivos				
no tiene	9 (69.2%)	17 (77.3%)	26 (74.3%)	0.613
<3	4 (30.7%)	3 (13.6%)	7 (20.0%)	
>3	0 (0.%)	1 (4.5%)	1 (2.86%)	
>5	0 (0.%)	1 (4.5%)	1 (2.86%)	
Practica sexo oral (OR = 0.321)*				
Si	13 (68.4%)	16 (41.0%)	25 (50.5%)	0.04
No	6 (31.6%)	23 (58.9%)	24 (49.5%)	

6.4 FRECUENCIA DE VPH16E7 EN BIOPSIAS DE LESIONES ORALES.

De las 106 muestras β -globina positivas, se encontró la presencia de VPH 16 con una frecuencia de ADN viral de 12.2 % (13/106). De los casos positivos para VPH, se excluyó un caso por incongruencia sociodemográfico.

En la figura 18 se visualiza el producto de la PCR realizada a muestras de lesiones orales por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y teñido con bromuro de etidio.

Figura 18. Amplificados de E7 de VPH 16 a partir de biopsias Orales: obsérvese amplicones con marcador de peso de 96 pb. (MPM). CK: control positivo Caski N o (-): Control Negativo CD= Condiloma HSE: Hiperplasia Seudoepiteliomatosa PE= Papiloma Escamoso CAE: carcinoma Escamocelular HE: Hiperplasia epitelial.



6.4.1. Distribución de las lesiones orales con resultados β -globina según topografía oral. De un total de 198 muestras embebidas en parafina, 106 amplificaron (53.5%) el gen de β -globina; el análisis de los datos de éstas muestras indica que de acuerdo a la topografía oral (ver resultados en la tabla 19), hubo una mayor frecuencia de lesiones fueron en carrillo (17%) orofaringe y amígdala (16%) el paladar con 13.2% y lengua (8,3%). los Carcinomas se presentaron con una frecuencia en lengua de un 16%(17/106), orofaringe del 9,4%

(10/106), seguido de las Hiperplasias en carrillo con el 7.6% (8/106), reborde alveolar 5.7%(6/106), Papilomas en paladar 5.7% (6/106), Condilomas en lengua 2.8% y Liquen Plano en paladar 0.9% (1/106).

Tabla 19. Distribución de las lesiones orales con resultados β -globina según topografía oral

Grupo diagnostico	Topografía									Total
	Lengua	Labio I	Paladar	Carrillo	RAS	ZRMI	FLS	AOE	Labio E	
Condiloma	3 (2.8)	1 (0.9)	1 (0.9)	2 (1.9)	0 (0.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (6.6)
Papiloma	3 (2.8)	4 (3.8)	6 (5.7)	6 (5.7)	1 (0.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	4 (3.8)	1 (0.9)	27 (25.5)
Hiperplasia	7 (6.6)	3 (2.8)	1 (0.9)	8 (7.6)	6 (5.7)	0 (0.0)	2 (1.9)	2 (1.9)	0 (0.0)	29 (27.4)
Hiperqueratosis	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.9)
Liquen plano	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)	0 (0.0)	2 (1.9)
Carcinoma	17 (16)	3 (2.8)	5 (4.7)	2 (1.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	0 (0.0)	10 (9.4)	0 (0.0)	39 (36.8)
Total	30 (28.3)	11 (10.4)	14 (13.2)	18 (17)	10 (9.4)	2 (1.9)	3 (2.8)	17 (16)	1 (0.9)	106 (100.0)

Labio I: labio inferior. Labio S: Labio Superior RAS: Reborde alveolar superior ZRI: Zona Retromolar Inferior AOE: Amígdala-Orofaringe-Encia Labio E= Labio externo

6.4.2. Características demográficas de género y edad en lesiones orales con presencia de ADN de VPH 16. en este grupo VPH16 positivo que estaba conformado por 13 muestras, el 64,5% de las lesiones pertenecían a mujeres y el resto a hombres, predominando dos grupos de edad entre 31 y 35 años y mayores de 70 años con frecuencias iguales (30.8%), 4 cada grupo, como se describe en la Tabla 20.

Tabla 20. Características demográficas género y edad con resultado de VPH

	VPH		Total (%)	OR	I.C 95%		p
	Positivo	Negativo					
Genero							
Masculino	5 (38.5)	78 (42.2)	83 (41.9)	0.8	0.2	2.8	0.701
Femenino	8 (64.54)	107 (57.8)	115 (58.1)	-	-	-	
Grupo de edad							
11 – 30	3 (23.1)	32 (17.9)	35 (18.2)	-	-	-	0.341
31-50	4 (30.8)	38 (21.2)	42 (21.9)	0.5	0.084	3.387	
51- 70	2 (15.4)	73 (40.8)	75 (39.1)	0.3	0.047	1.834	
> 70	4 (30.8)	36 (20.1)	40 (20.8)	1.2	0.246	5.702	

6.4.3 Caracterización histopatológica del grupo de lesiones orales

VPH16E7 positivas. Entre las patologías con VPH16 Positivas se encontraron 6 Papilomas ,2 Condilomas, 3 Hiperplasias que fueron subclasificadas como una Hiperplasia Seudoepiteliomatosa, una Hiperplasia con Hiperqueratosis (Leucoplasia Verrugosa Proliferativa), una Leucoplasia con Displasia moderada, además un Liquen Plano y un Carcinoma Escamocelular infiltrante.

Con relación a los diferentes diagnósticos en la tabla 21 se muestra una distribución de las lesiones según su comportamiento biológico y la frecuencia relativa , teniendo en cuenta que de todas las muestras de cavidad oral se obtuvo 155 muestras positivas para β -globina es así como la presencia de VPH-16 se observa un 14.5% de las lesiones benignas (9/62). Entre las lesiones premalignas se encontraron 3 muestras positivas de un total de 5 (40%). Finalmente de las 39 lesiones con Carcinoma se encontró sólo un caso VPH Positivo (2.6%).

Con relación a la frecuencia relativa entre las lesiones VPH positivas se encontró para lesiones benignas: un 23% en los diagnósticos de Papilomas (6/26), un

28.5% en lesiones de Condilomas (2/7), 3.7% de Hiperplasias Epiteliales (1/27) y de Hiperqueratosis ninguna fue positiva (0%).

La frecuencia relativa entre las muestras positivas de lesiones premalignas teniendo en cuenta que 5 muestras fueron β -globina positivas se encontraron: una Leucoplasia verrugosa proliferativa (1/5) correspondiendo a un 20%, con relación a la Hiperplasia Epitelial con displasia moderada se detectó en dos con este diagnóstico (2/5) correspondiendo a un 40% y de Liquen Plano (2/5) correspondiendo a un 40%. De las lesiones premalignas fueron Positivas para VPH16 una leucoplasia verrugosa proliferativa (1), una Hiperplasia Epitelial con displasia moderada y un Liquen Plano. Para un total de 13 muestras.

Tabla 21. Frecuencia de VPH16 en Mucosa Oral

Tipo de Lesión n=106	Diagnóstico	β -globina/ %relativo Lesión	VPH+	Proporción VPH+
Sin lesión n=49 (31.6%)	Mucosa oral sana	49 (100)	22	44.0%
Lesiones benignas n=62 (40.0%) 14.5% VPH+	Papiloma	26 (41.9)	6	23.0%
	Condiloma	7 (11.2)	2	29.6%
	Hiperplasia epitelial	27 (43.5)	1	3.7%
	Hiperqueratosis	2 (3.2)	0	0%
Lesiones premalignas n=5 (3.2%) 60% VPH+	Leucoplasia verrugosa proliferativa *	1 (20)	1	100%
	Hiperplasia epitelial con displasia moderada*	2 (40.0)	1	50%
	Liquen plano oral	2 (40.0)	1	50%
Malignas n=39 (25.1%)	Cáncer Escamoso	39 (100)	1	2.6%
Total		155 (100%)		

Con relación a la frecuencia absoluta de lesiones VPH positivas en las muestras β -globina positivas se tiene los siguientes resultados: Papiloma el 5.66% (6/106),

Condilomas el 1,88% (2/106), Hiperplasias el 2.83%(3/106), Liquen Plano con el 0,94%. (1/106), Carcinoma Escamocelular el 0,94%. (1/106).

6.4.4. Caracterización según diagnóstico y topografía con presencia de VPH

16. A continuación se describen los diagnósticos de las 13 muestras con presencia de VPH16 de los cuales el más frecuente fue Papiloma con un 46.1% (6/13) seguidas de 3 hiperplasias con un 23.1% (3/13) con diagnósticos de hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperplasia con displasia epitelial moderada y una hiperplasia con hiperqueratosis descrita como leucoplasia verrugosa proliferativa. Además se presentaron 2 Condilomas con un 15.4% (2/13) un liquen plano correspondiendo a un 7.7% (1/13) y un carcinoma escamocelular igualmente con un 7.7% (1/13)

Con relación a la topografía, las lesiones se presentaron en sitios anatómicos distribuidos en toda la cavidad oral. La distribución de la presencia de la infección por VPH16E7 en los diferentes sitios de la cavidad oral fue así : zona determinada como "otros" que incluyeron amígdala, orofaringe, encía, labio superior se presentaron 4 lesiones correspondiendo a un 30.8% (4/13); lengua, labio inferior y paladar en proporciones iguales con un 15% , dos por cada lesión (2/13) y reborde alveolar superior con una lesión correspondiendo a 7.7% (1/13).

Tabla 22. Caracterización según diagnóstico y topografía con resultado de VPH

	VPH		Total (%)	OR	I.C 95%		p
	Positivo (n=13)	Negativo (n=93)					
Diagnóstico							
Condiloma	2 (15.4)	5 (5.4)	7 (6.6)	-	-	-	0.01
Papiloma	6 (46.1)	21 (22.6)	27 (25.5)	0.56	0.10	3.28	
Hiperplasia	3 (23.1)	26 (27.9)	29 (27.4)	0.19	0.03	1.30	
Hiperqueratosis	2 (0.0)	2 (2.1)	2 (1.9)	-	-	-	
Liquen plano	1 (7.7)	1 (1.1)	2 (1.9)	4.00	0.17	95.76	
Carcinoma escamocelular	1 (7.7)	38 (40.9)	39 (36.8)	0.06	0.01	0.76	
Topografía							
Lengua	2(15.4)	28(30.1)	30(28.3)	-	-	-	0.81
Labio inferior	2(15.4)	9(9.7)	11(10.4)	3.2	0.414	24.706	
Paladar	2(15.4)	12(12.9)	14(13.2)	1.412	0.189	10.522	
Carillo	2(15.4)	16(17.2)	18(16.9)	1.7	0.2	12.9	
Reborde alveolar superior	1(7.7)	9(9.7)	10(9.4)	1.333	0.1	15.619	
Zona retromolar inferior	0(0)	2(2.1)	2(1.8)	-	-	-	
Frenillo labial superior	0(0)	3(3.2)	3(2.8)	-	-	-	
Otros (amígdala-orofaringe-encía, labio superior	4(30.8)	13(13.9)	17(16.0)	3.3	0.6	19.2	
Lesiones verrugosas							
Lesión verrugosopapilar	12 (92.31)	52 (55.9)	42 (39.6)	7.474	0.951	58.721	0.026
Carcinoma escamocelular	1 (7.7)	41 (44.1)	64 (60.4)	-	-	-	
Total	13 (12.3)	93 (87.74)	106 (100.00)				

6.5 CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LAS LESIONES VERRUGOSOPAPILARES

Debido a que el diagnóstico de las lesiones verrugosopapilares son sugestivas de presencia viral al observarlas al microscopio, se describió cualitativamente las características histopatológicas de estas lesiones, los hallazgos histopatológicos se pueden resumir como sigue:

En las lesiones verrugosopapilares se encontró coilocitos en el 50.4% de las muestras distribuidos en la capa basal y capa superficial (27.7%??). Se observó alteración del coilocito presentando núcleo completo con vacuolación citoplasmática en el 24.4% de las muestras. Presencia de queratina en la mayoría de ellas (95%) y el 96,64% presentó la membrana basal preservada En el análisis de las lesiones con displasia epitelial se encontró que el 42.9%,— fueron clasificadas como leves; se observaron células mitosoidales en el 42% de las lesiones estudiadas, y predominó escaso infiltrado inflamatorio (40.34%). La tabla 23 resume los hallazgos obtenidos en el análisis histopatológico.

Tabla 23. Caracterización histopatológica de las Lesiones Verrugosopapilares

Característica	n	Porcentaje
Coliocytes		
Si	60	50.4
No	59	49.6
Distribución coliocytes		
Capa Basal del epitelio	1	0.8
Capa basal - espinosa	22	18.5
Capa Espinosa y Capa Superficial	33	27.7
Capa Superficial	4	3.36
Ausente	59	49.58
Alteración células coliocytes		
Núcleo completo + VC	15	12.6
Núcleo delgado granuloso+ VC	29	24.4
Sin núcleo + VC	12	10.1
Dimorfismos	4	3.4
Sin dato	59	49.6
Presencia de queratina		
Si	113	95.0
No	6	5.0
Displasia epitelial		
Con células mitosoidales	50	42.0
Displasia leve	51	42.9
Displasia moderada	11	9.2
Displasia severa	7	5.9
Infiltrado epitelial		
No presenta	30	25.21
Escaso	48	40.34
Leve	23	19.33
Moderado	18	15.13
Membrana basal		
Si	115	96.64
No	4	3.36
Total	119	100.0

6.5.1 Caracterización histopatológica de las lesiones verrugosopapilares con presencia de VPH16E7. La tabla 24 describe las principales características histopatológicas de las lesiones verrugosopapilares con ADN de VPH16. Se observó un predominio de coilocitos entre la capa espinosa y basal en el 75%. El 50% de las lesiones orales presentaron coilocitos, con núcleo delgado y granuloso, con vacuolización citoplásmica; se observó presencia de queratina en todas las lesiones. Con relación a los cambios estructurales y celulares, se encontró una mayor frecuencia de cambios displásicos leves, presencia de células mitosoidales con una frecuencia de 37,5% cada una, como se observan en Se encontraron dos casos (25%) de displasia moderada. El infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario fué leve (37.5%); en siete lesiones se conservó la membrana basal y en una hubo pérdida de la continuidad de la membrana. las figuras 19 y 20 muestran representativamente las características clínicas e histopatológicas observadas en lesiones verrugosopapilares correspondientes a Papiloma y Condiloma. En la Fig. 19 A y A1 clínicamente los Papilomas se presentan de forma exofítica o sobresaliente de la mucosa de forma papilar y de diferentes tamaños, del mismo color de la mucosa. Nótese en cortes con tinción de hematoxilina y eosina la presencia de hiperqueratosis Fig. 19 B, Los cambios celulares del tipo núcleo completo y vacuolización citoplasmática; también se observan escaso núcleo denominadas coilocitos, Fig. 19 C. La presencia de múltiples células con núcleos semejando una mitosis atípica por lo que toman el nombre de mitosoidales (en el círculo azul).

La Figura 20 A muestra representativamente un Condilomas el cual se presenta clínicamente como exofítico nodular, y superficie irregular del mismo color de la mucosa o de color rosa La Fig. 20 B muestra un campo en 4X con hiperplasia epitelial y presencia de coilocitos a mayor aumento 20C la presencia de células mitosoidales en círculo azul. Fig. 20D nótese la presencia de células con citoplasma vacuolado y escasos núcleos.

La figura 21 A muestra la representación clínica correspondiente a una Hiperplasia con hiperqueratosis correspondiendo a una Leucoplasia verrugosa proliferativa se observa en forma de placa elevada papilar verrugosa blanquecina , extendida en el reborde alveolar y parte de mucosa de carillo interno .En la Fig. 21B se observa en objetivo 10x la presencia de una gruesa capa de hiperortoqueratosis (capa más superficial del epitelio con formación de queratina) y en la Fig. 21 C en aumento de lente 40X se destaca la presencia de células con presencia viral (coilocitos), Característica no muy frecuente en este tipo de diagnóstico pero observable en este caso VPH positivo.

Tabla 24. Comportamiento de la caracterización histopatológica de las lesiones Verrugosopapilares VPH Positivos

	VPH		Total (%)	OR	I.C.95%		p
	Positivo	Negativo					
Distribución coilocitos							
Capa.Basal del epitelio	0 (0.0)	1 (1.8)	1 (1.7)	-	-	-	0.843
Capa. basal - espinosa	1 (25.0)	21 (37.5)	22 (36.7)	6.20E+06	6.00E+05	6.40E+07	
Capa.Espinosa y Capa.Superficial	3 (75.0)	30 (53.6)	33 (55.0)	1.30E+07	1.30E+07	1.30E+07	
Capa.Superficial	0 (0.0)	4 (7.1)	4 (6.7)	-	-	-	
Alteración célula coilocitos							
Núcleo completo + VC	0 (0.0)	15 (26.8)	15 (25.0)	-	-	-	0.205
Núcleo delgado granuloso+ VC	4 (100.0)	25 (44.6)	29 (48.3)	0.16	0.056	0.46	
Sin núcleo + VC	0 (0.0)	12 (21.4)	12 (20.0)	-	-	-	
Dismorfismos	0 (0.0)	4 (7.1)	4 (6.7)	-	-	-	
Presencia queratina							
Si	8 (100.0)	105 (94.6)	113 (94.9)	-	-	-	0.500
Nb	0 (0.0)	6 (5.4)	6 (5.1)	-	-	-	
Displasia epitelial							
Con células mitóticas	3 (37.5)	47 (42.3)	50 (42.0)	-	-	-	0.406
Displasia leve	3 (37.5)	48 (43.2)	51 (42.9)	0.979	0.188	5.099	
Displasia moderada	2 (25.0)	9 (8.1)	11 (9.2)	3.481	0.507	23.892	
Displasia severa	0 (0.0)	7 (6.3)	7 (5.9)	-	-	-	
Infiltrado epitelial							
Nb presenta	2 (25.0)	28 (25.2)	30 (25.2)	-	-	-	0.300
Escaso	1 (12.5)	47 (42.3)	48 (40.3)	0.298	0.026	3.437	
Leve	3 (37.5)	20 (18.0)	23 (19.3)	2.1	0.321	13.748	
Moderado	2 (25.0)	16 (14.4)	18 (15.1)	1.75	0.224	13.648	
Membrana basal							
Si	7 (87.5)	108 (97.3)	115 (96.6)	-	-	-	0.138
Nb	1 (12.5)	3 (2.7)	4 (3.4)	5.143	0.472	56.058	

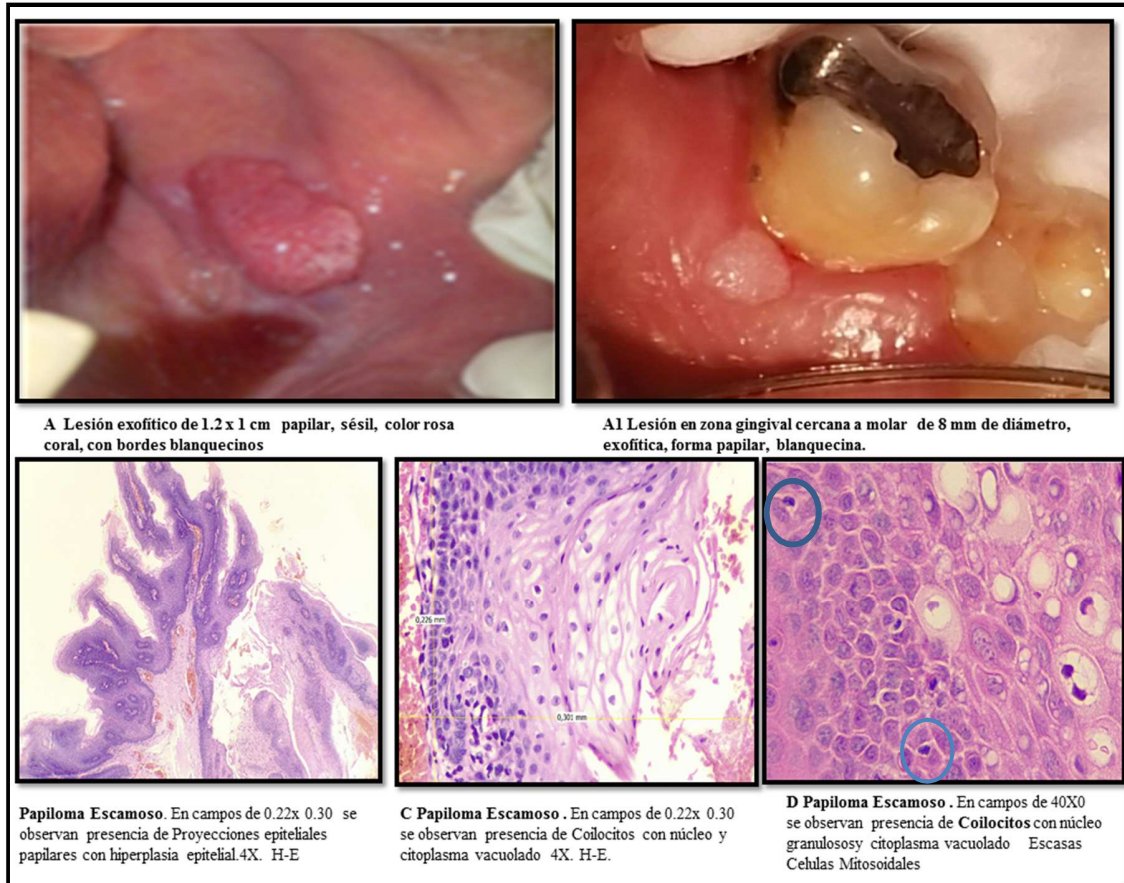
De acuerdo a los análisis presentados en este estudio, se puede resumir que en este grupo de muestras de mucosa oral de una población colombiana, la

frecuencia de VPH16, en muestras de mucosa sana fue 1.8 veces mayor que en las lesiones valoradas, este grupo portador de VPH16 se conformó de un mayor porcentaje de muestras del género femenino, que pertenecían a la etnia mestiza principalmente, en su mayoría con estudios a nivel universitario. La presencia del ADN viral fué asociada a la práctica de sexo oral ($p=0.04$). En el grupo de lesiones orales que presentaron VPH16 se encontró un mayor porcentaje de Papilomas, seguido de Hiperplasia y Condilomas. Las topografías más relevantes de expresiones orales fueron lengua, carrillo y paladar. Las características histológicas que se encontraron en lesiones Verrugosopapilares con VPH16 fueron Hiperqueratosis, Hiperplasia Epitelial, Coilocitosis y cambios celulares mitosoidales.

6.6. REGISTRO HISTOPATOLÓGICO DE LESIONES CON MUESTRA CLÍNICA

Presentación fotográfica de lesiones observadas y resultados VPH Positivo. Y un soporte clínico (guía) de patologías representativas.

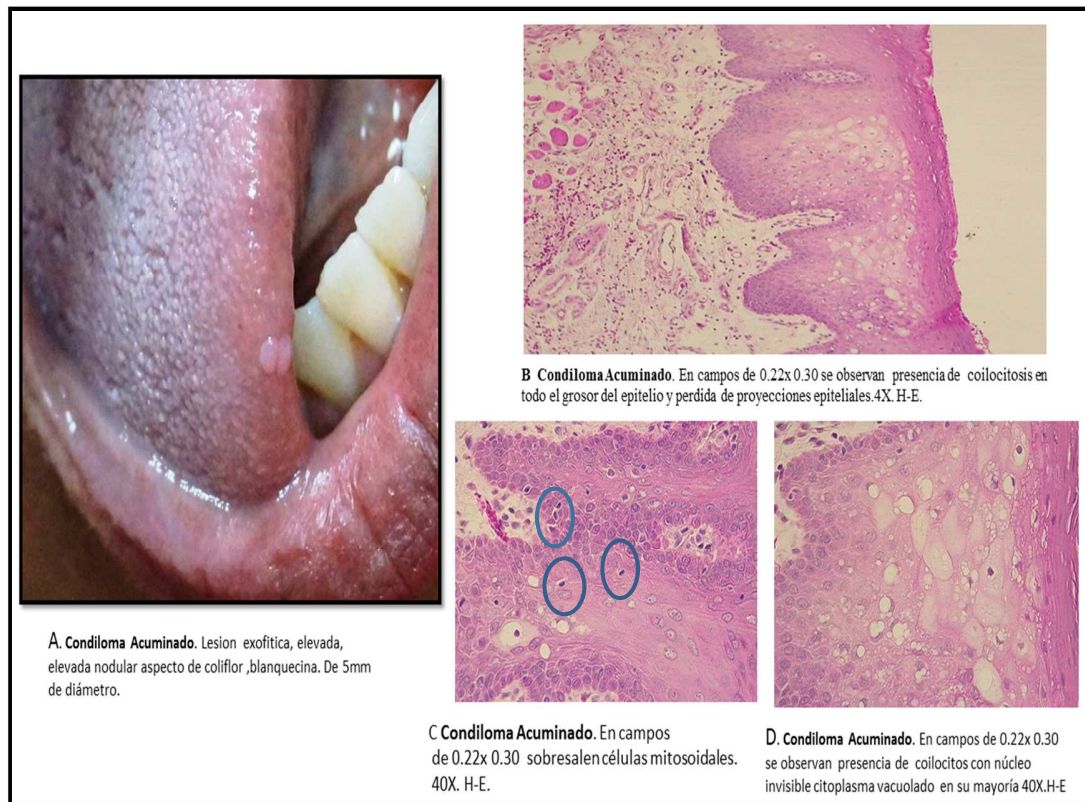
Figura 19. Papiloma Escamoso



Fuente. Archivo Dolly Aristizábal 2016

Fig. A Lesión exofítica de 1.2 x 1 cm papilar, sésil, color rosa coral, con bordes blanquecinos **A1**. Caso representativo, muestra clínica de lesión en zona gingival cercana a molar de 8mmts de diámetro, exofítica, forma papilar, blanquecina. **B**. En campos de 0.22x 30, presencia de proyecciones epiteliales papilares con hiperplasia epitelial. 4X. H-E. **C**. En campo de 0.22 x 0.30 se observan coilocitos con núcleos completos y citoplasma vacuolado. 10X. H-E. **D** En otro campo, nótese coilocitos con núcleo granuloso y vacuolado citoplasmico y otros con núcleo invisible y citoplasma y presencia de células mitosoidales.

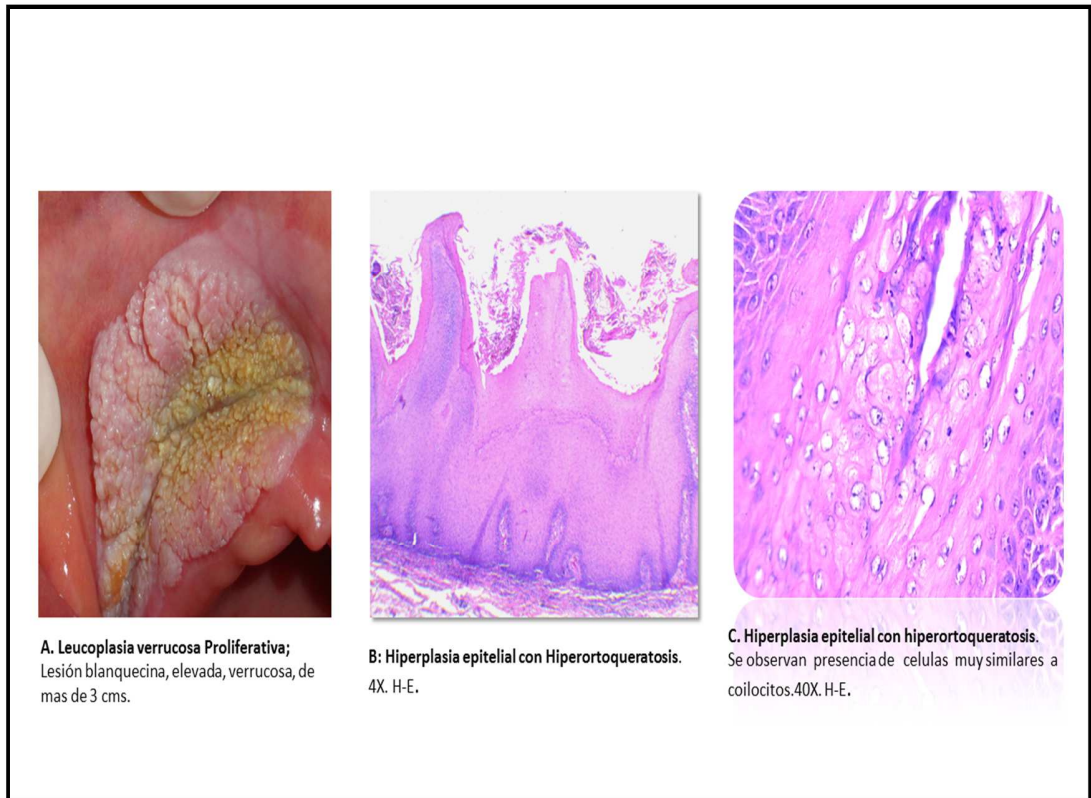
Figura 20. Condiloma Acuminado.



Fuente. Archivo Dolly Aristizábal 2016

Fig. A Lesión exofítica elevada nodular superficie rugosa (aspecto de coliflor) blanquecina de 5 mm de diámetro. **B.** En campos de 0.22x 0.30, presencia de coilocitosis en todo el grosor del epitelio y escasas proyecciones epiteliales. 4X H-E **C.** Vista 10X se observa la presencia de células mitosoidales (Circulo) **D.** Se Observa presencia de coilocitos sin núcleo y citoplasma vacuolado en el grosor de dos capas epiteliales. 40X H-E

Figura 21. Leucoplasia verrugosa proliferativa.



Fuente. Archivo Dolly Aristizábal 2016

Fig. A Lesión sobrelevada, blanquecina verrugosa de más de 3 cms. Abarcando más de dos zonas de la cavidad oral, de más de 3 cms de extensión. **B.** En campos de 0.22x0.3, presencia de hiperplasia epitelial con hiperortoqueratosis de forma papilar. 10X H-E **C.** En vista más cercana se observan células con degeneración hidrópica (Coilocitos) en zonas interpapilar sugestiva de presencia viral 40X.H-E

7. DISCUSION

El Cáncer oral es el séptimo más frecuente tipo de cáncer a nivel mundial y en Colombia ocupa una posición similar. Su etiopatogenia es aun controversial aunque se reconoce como una enfermedad de origen multifactorial. Entre sus factores de riesgo se destacan el hábito de masticar o fumar tabaco, el consumo excesivo de alcohol, pobre higiene oral, mala alimentación y la infección por VPH de alto riesgo (3)(13)(20). Con relación a la infección por VPH, se ha encontrado su asociación con el 30% de los casos de Cáncer oral. De acuerdo a diversos estudios, se reconoce que ésta infección viral se presenta frecuentemente en mucosa normal, en lesiones potencialmente malignas y en lesiones exofítica benignas. El objetivo principal de esta investigación fue determinar la presencia de VPH16 a través de la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína E7, en muestras de mucosa de la cavidad oral, en una cohorte de una población de la ciudad de Cali, y establecer los factores de riesgo asociados a dicha infección.

Los numerosos estudios con relación a esta infección han evidenciado que el VPH tiene la capacidad de producir infección latente y que la existencia de cofactores puede permitir la expresión de los oncogenes virales (83) (84).

7.1. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN POR VPH EN MUCOSA ORAL

Los factores de riesgo sociodemográficos, como la edad, el género, bajo nivel económico y educativo, los de comportamiento social como alcoholismo, tabaquismo, problemas alimentarios, de comportamiento sexual, los que incluyen múltiples parejas, sexualidad sin control, inicio de actividad sexual a temprana

edad, y los biológicos como sistema inmune deficiente, enfermedades debilitantes, deficiente higiene oral, microabrasiones y lesiones erosivas crónicas expuestas, potencian la infección por VPH a nivel oral(85)(86)(87).

La población de este estudio en su mayoría fue joven, con una edad promedio de 32 años, la infección se presentó con mayor frecuencia en jóvenes, en el rango de edad entre 18 a 25 años (71%), similar a al reporte de *Ceballos C y col.2009*, quienes refieren mayor prevalencia de la infección en menores de 30 años la infección es transitoria, considerándola normal, pero su persistencia puede causar lesiones premalignas y en su defecto malignas. (88)

Los estudios epidemiológicos han permitido considerar que la edad y género femenino son factores determinantes en esta infección, debido a la influencia hormonal(89), comportamiento social y sexual. Un elevado porcentaje de la juventud inicia su vida sexual entre 15 a 19 años. Los resultados de este estudio presentaron un predominio del grupo joven entre los 18 y 25 años con un 72.7 % Estos datos contrastan con los de *Tristao et al* quienes hallaron una prevalencia de 23.2% en estos rangos de edad (90).

En los participantes de este estudio, a pesar que la mayoría fueron mujeres (66.7%), no se encontró asociación de género con la presencia de la infección por VPH, $p = 0.54$. Estos resultados fueron similares a los de *Ruiz et al* y *Ball et al*. Quienes encontraron presencia de VPH de alto riesgo en mucosa oral en mujeres en un 70% y , 80% respectivamente,(91)(92). Contrariamente *Giraldo et al* en el 2006(93) registraron menor incidencia de la infección en mujeres, al igual que en el estudio de *Terai et al*, quienes registraron mayor predominio en hombres (56% y80%)(94). La razón de esta mayor prevalencia en las mujeres quizá se explica la anatomía y fisiología de los genitales, la humedad y carga estrogénica (21); así mismo, la constitución del epitelio mucoso cervical rico en células escamosas, la humedad y el calor se convierten en un reservorio importante del virus (95).

Relacionando la cavidad oral y la vagina, estructuralmente son muy similares, principalmente en sus células epiteliales, blanco de la infección por VPH oncogénicos (VPH-16 y VPH-18).

Otro factor de riesgo es el consumo por más de 10 años, de anticonceptivos orales, que aumenta el riesgo de adquirir la infección en cérvix por VPH en cuatro veces (99). Este dato no fue incluido en la encuesta de este estudio, una limitante para analizar ésta asociación. Con relación a los estrógenos se reconoce que se asocia a cambios en el epitelio endocervical (ectropión) , una eversión glandular , expuesta el cual presenta una inmunidad debilitada, aumenta la susceptibilidad a las infecciones vaginales y permite replicar infecciones externas entre las que se incluye el VPH (*Cruz et al* 2004)(21).(96)

En cuanto al factor de historial reproductivo de las pacientes infectadas por VPH en cavidad oral, en el presente estudio 30% habían tenido al menos un embarazo, datos similares a los encontrados por Hernández et al, (39%)(86) , sin embargo, no se encontró asociación de esta variable con la infección por VPH ($p= 0,549$).

Con respecto al consumo de alcohol en general, éste factor varía en el mundo y depende de la ubicación geográfica y del género. El 44% de la población en el mundo toman licor, principalmente hombres (55%)(97) . Se ha estimado que el uso de 5 bebidas diarias tiene 40 veces más riesgo de desarrollar CCO(18). La relación del consumo excesivo de alcohol con la infección por VPH se explica por el hecho que el etanol presente en las bebidas genera disolución lipídica de la membrana celular, produciendo lesiones epiteliales que pueden aumentar el ingreso del VPH a la célula e inhibe la síntesis de la proteína *p53* que participa en el del ciclo celular, favoreciendo la invasión por el virus a las células.(21). En este estudio no se observó relevancia o asociación con la infección por VPH, con el consumo de alcohol a pesar que 71.4% tomaban licor ($p=0.23$) ocasionalmente.

Con referencia al hábito de fumar en este estudio es de destacar el número de participantes que no tienen este hábito el cual fue mayor (14/22) con un 63.6% ($p=0.874$). lo que puede influir en no haberse encontrado asociación estadísticamente significativa A pesar que el tabaco contiene aproximadamente 50 carcinógenos potenciales (entre los que se mencionan nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos y aromáticos), que pueden promover las mutaciones en genes que participan en la regulación del ciclo celular como proto-oncogenes y de supresores de tumores (ej. p53) que en su medida aumentan el riesgo de padecer la infección(21). *Gilison et al.*, y varios autores más reportan que la infección por VPH es más frecuente en los hombres fumadores(98)(99).

Con relación a la etnia, este estudio registró 39.1% con etnia mestiza como más relevante, relativamente similar al encontrado en lesiones de papiloma en Venezuela por *Jiménez et al 2002* (56.1%) (100). Hernández y col 2012 refiere que se registra mayor prevalencia de la infección en la raza mestiza por sus características biológicas y culturales propias y factores medioambientales relacionados. Con este grupo étnico asociado con mayor riesgo de infección por VPH, quizás por la vulnerabilidad de las poblaciones con escasas condiciones de higiene, nutrición, económicas, de educación y además, con comportamientos sexuales sin protección y poco acceso a los servicios de salud. (86)

En cuanto al comportamiento sexual de los participantes y su relación con VPH, de este estudio donde la mayoría de los infectados fueron mujeres (68.2%) y reportaron tener una vida sexual activa. A diferencia de otros estudios hechos en México, donde se reporta mayor frecuencia de la infección en los hombres quienes son más activos sexualmente (69.9%) (101).

En el presente estudio se encontró que la primera relación sexual se presentó entre los 15 y 18 años en un 75% de los participantes (ver Tabla 14). *Melo y Waliszewski* en el 2009 refieren que el inicio de las relaciones a menor edad y el

incremento en el número de parejas sexuales están asociados con la reinfección por VPH de alto riesgo(102). En éste estudio no hubo asociación entre la frecuencia de VPH y el número de compañeros sexuales, la mayoría (61.7%) de los participantes tenían una sola pareja sexual ($p= 0,768$). estos resultados son similares a otros estudios(103).

El factor que presento asociación estadística con la presencia de VPH16 es la práctica de sexo oral y la infección por VPH entre los participantes (68.4%) que aceptaron realizarlo, con un $p=0.044$. (Tabla18). *Cardesa y Nadal*, registran que el sexo oral, es uno de los principales factores de riesgo para la progresión de la infección por VPH(104), resultado similar reportado por De Souza G et al. (2009), en un estudio realizado en estudiantes universitarios estadounidenses, donde la práctica oral ($p=0,046$) y práctica de besos profundos ($p=0,023$) fueron asociados con el desarrollo de la infección por VPH(105).

En este estudio el 56,25% de las mujeres (9/16) y el 66,6% de los hombres (4/6) aceptaron tener práctica de sexo oral. Mosher WD, et al. (2005) en una encuesta aplicada acerca del comportamiento sexual a 12,571 habitantes de una población de en Estados Unidos, encontró que el 90% de los hombres y el 88% de mujeres han tenido prácticas de sexo oral, (106). Sánchez y col en estudio realizado a 46 paciente VPH positivas a nivel genital, reportó que el 35% presentaron VPH16 a nivel oral y aceptaron realizar prácticas de sexo oral (107). Además se ha demostrado que tener muchos compañeros sexuales se asocia con una mayor prevalencia de esta infección en cérvix (98), contrariamente otros autores reportan que en las parejas monógamas hay menos prevalencia de la infección en cérvix, por VPH (108), y esto puede ser un factor riesgo para infección oral. Aunque en la mujer el riesgo de infectarse por VPH, no está definido solo por el número de sus parejas sexuales, sino además por el número de parejas sexuales de su marido , Castellsagué *et al*, demostraron que la presencia VPH en el pene aumenta del riesgo de cáncer de cuello uterino a su cónyuge(109).

El 69.6% de los voluntarios de este estudio positivos para VPH —fueron solteros, resultado similar a un estudio realizado en Cuba (66,7 %)(110), teniendo en cuenta que los eventos de encuentros amorosos es mayor en los solteros que en los casados, el riesgo de adquirir la infección aumenta, aunque en éste estudio no hubo asociación al respecto con esta variable (dato no mostrado).

Debido a que las muestras de mucosa oral sana fueron tomadas por conveniencia, con mayor participación de estudiantes de la Universidad Santiago de Cali, esta no es representativa de la población de Santiago de Cali. el nivel de escolaridad de mayor frecuencia fue universitario sin embargo, no se observó asociación entre la escolaridad y la presencia de VPH (dato no mostrado). Al respecto de este factor de riesgo, estudios como el realizado con 356 jóvenes por *Leigh y et al*, refieren que las personas con alguna educación superior tienen más probabilidades de haber tenido 5 o más parejas sexuales en los últimos 5 años comparado con las personas que no han terminado sus estudios de secundaria (111).

En cuanto a los ingresos de la población de este estudio, que fueron principalmente estudiantes universitarios (el 43.5 % reportaron ingresos de un salario mínimo vigente (SMMLV), (como un medio básico de auto sostenimiento). No es posible considerar la situación en la población general, donde los pocos recursos económicos se asocian con un bajo nivel educativo se ha demostrado que en poblaciones de un bajo nivel de educación es mayor el desconocimiento de los riesgos de exposición a enfermedades, incluyendo los relacionados con éste tipo de infección. Esto lo confirma un estudio que evaluó *Dahlstrom K et al*, 2015, mediante una encuesta acerca del conocimiento de VPH en 468 mujeres jóvenes (9-17 años) con bajos ingresos con diagnóstico de VPH genital (89%)(112).

A nivel local, en la cavidad oral el virus se inocula al contacto mucosa- mucosa, mucosa- piel y en zonas erosionadas. La boca es una cavidad topográfica con alto riesgo de erosión mucosa por diversos factores como habito de mordida, usos de prótesis total y removible, uso de aparatología ortodóntica, uso de pearcing, mucositis, higiene oral deficiente. Además, el virus puede ubicarse en fluidos gingivales en periodontitis crónica, Escalona (2011). Esto lo corroboran investigadores de la Universidad de Búfalo y el Instituto del Cáncer Roswell Park, quienes refieren la asociación que presentaron pacientes con presencia de cáncer en lengua y presencia de VPH de alto riesgo; encontrando en el 62% de los pacientes valorados, diagnóstico de periodontitis, lo que sugieren que esta alteración puede potencializar el desarrollo neoplásico. (113)(114)

7.2. PORCENTAJE DE MUESTRAS DE ADECUADA CALIDAD DE ADN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE VPH16

Del total de 49 ADN extraídos de mucosa oral sana de los participantes, se logró amplificar el *gen β -globina* y de éstos, en 22 muestras se detectó VPH16 al amplificar el gen E7, correspondiente al 44.8% del total de las muestras, cifra similar al estudio preliminar hecho por los investigadores *Jalal et al* (115) *Mancilla et al 2012*(6) , quienes registraron valores similares de y 43% y 43.7% respectivamente.

7.2.1 Determinación del GEN E7 de VPH 16 Mediante PCR. En este estudio se encontraron limitaciones cualitativas y cuantitativas, como la poca cantidad de ADN extraído de las muestras, razones que hicieron rechazar cuatro de las 70 muestras. Se logró amplificar el gen de *β -globina* a partir del 75,35% de las muestras de ADN extraído, indicando que en 24.7% de las muestras que no amplificó este gen, pudo ser por la presencia de acidez, cambios de pH en la saliva, sustancias extrañas y baja densidad celular (*Mancilla et al 2012*) (6). Según. Mravak M, 2013 es vital tomar las muestras de mucosa oral en toda la

topografía bucal, porque aumenta la densidad celular y en efecto mayor posibilidad de extraer ADN para detectar VPH (116).

Teniendo en cuenta los efectos de degradación del ADN obtenidos a partir de biopsias parafinadas, el formaldehído residual juega un papel importante como limitación (*Karlsen et al 1994*) en la detección del ADN β -globina y en el incremento de los falsos negativos en las PCR (117), en contraste con las muestras directas, como el hisopado de la mucosa oral, donde no se presentan estos efectos químicos. Para gen de β -globina en mucosa oral se usaron cebadores que amplificaron fragmentos grandes (268 pb) de manera exitosa. En contraste, para amplificar ese mismo gen en las biopsias parafinadas, se usaron cebadores que amplificaron fragmentos pequeños (110 pb), que permitieron mayor frecuencia de amplificados y mejor visualización.

Existe mucha controversia en cuanto a la prevalencia de la infección por VPH en cavidad oral. En el mundo los registros de VPH de alto riesgo oral varía entre 0 a 81% (*Eskenazi et al y Terai*)(54)(94). En este estudio la frecuencia de VPH en mucosa oral sana fue de 44%, probablemente porque las muestras provenían de toda la cavidad oral, considerándose como una fortaleza de esta investigación, resultados similares se los muestra Mancilla y col 2012 con 43.7% (21/48) y Jalal/1992 con 43% (8/18) ,*Sánchez et al* (107) detectaron 35% de infección (boca, paladar y encía), en mucosa oral tomada por hisopados y usando PCR múltiples (cebadores MY9 y MY11 y GP5+ y GP6+), que aumenta la posibilidad de detección del VPH; Algunos investigadores como *Kurose et al*, *Flake et al* (118) y *Turner et al*¹⁴⁴ obtuvieron una prevalencia baja de VPH (0,4%, 2,5 %, 2,6% respectivamente) (119) mientras que *Eskenazi et al*, *Aguirre et al* y *Bouda et al* (54)(120)(121) no encontraron la presencia de VPH en mucosa sana (0 %).

Estas diferencias se pueden atribuir a la variedad metodológica usada en estos estudios, o por la sensibilidad de las técnicas moleculares empleadas para la

detección de VPH, que influyen en efecto en los resultados. Es importante destacar que la mayoría de estudios generalmente detectan VPH a través del uso de cebadores consenso (MY9, MY11, GP5 y GP6) y algunos por determinación del gen *E6* o del gen *E7*, por el uso de ambos o por el uso de PCR múltiple. En este estudio se detectó la presencia del gen *E7* en mucosa sana en 44.8% de las muestras (22/49), registro similar al de *Mancilla et al* 2012(6) en Colombia y de *Sánchez et al* 2010(107) en México, quienes hallaron 43.8% y 35% respectivamente. Cabe mencionar que *Jalal et al* 1992(115) en Inglaterra, detectaron una prevalencia similar de VPH de 44% determinando la presencia del gen *E6*. La diferencia en la prevalencia de VPH 16 en los estudios con el uso de muchas técnicas, amerita realizar un estudio multicéntrico que permita determinar las condiciones estándares para su detección.

7.3. PRESENCIA DE VPH16 EN LESIONES BENIGNAS Y PRECURSORAS DE CÁNCER

En el grupo de lesiones VPH -16 Positivas de éste estudio, el porcentaje de mujeres con VPH16 fue de 64.54% (8 muestras de (8/13), mientras en hombres esta frecuencia fue de sólo 38.5% (5/13), contrario a *Mravak M et al*(116) donde en un subgrupo de lesiones analizadas, el porcentaje de hombres con VPH es mayor (27.1% en hombres y 13% en mujeres).

En cuanto a la presencia de VPH16 en tejidos con lesiones BENIGNAS precursoras de cáncer, en éste estudio la mayoría de las lesiones infectadas fueron Hiperplasias con 33% (66/198), grupo que incluye lesiones con Hiperqueratosis, Hiperplasia pseudoepiteliomatosa, displasia leve y moderada, seguida de Papilomas con un 24.8% y Condilomas con 5.1%

En cuanto a la presencia de VPH16 en lesiones orales como Papiloma y Condilomas, varias evidencias moleculares han reportado registros menores a

éste estudio como *Mravak M. et al, 2013* (116) con un 2,9% (6/204), *García et al 2009*(57) con reportes de 7.5% (8/106), *Syrjanen et al 1987*(48) quienes detectaron 8,9% (4/54) frecuencia similar a la detectada en este estudio de 7.54% (6/106 y 2/106), Otros estudios reportan valores como *Gonzales et al*(3) con 30% (3/10), y *Mancilla et al 2011* con 21% (4/19),(7) (dato en proceso de publicación). Teniendo en cuenta las anteriores reportes y los hallazgos presentados por *Almadori et al 2001*(122), quienes evidencian el efecto de VPH sobre expresión de factor de crecimiento epidermal (FCE), implicado en la transformación de lesiones Hiperplásicas y Carcinoma Escamocelular, los resultados sugieren que la asociación entre VPH oncogénico y estas lesiones, son bastante divergentes, en la clasificación de estas lesiones consideradas como benignas,

El manejo de otras técnicas moleculares como el realizado por Ghasaq Al-Bakkal/1999, con *rtRNAm* PCR (Reacción en cadena de polimerasa, RNA transcriptasa reversa in situ) permitió detectar la presencia de VPH16 en un 90% (9/10) en un estudio realizado en pacientes inmunosuprimidos) de lesiones benignas no displásicas (123). Lo que lleva a considerar la utilidad de otras técnicas que permitan la detección de VPH.

Con relación a las hiperplasias, generalmente la etiología de estas lesiones ha sido documentada por causas traumática, o aparecen de manera espontánea sin razón determinada. Son escasos los estudios que asocian VPH-16 con estas lesiones. *Mravak M. et al, 2013* (116) encontró una prevalencia de VPH-16 en un 1.1% (1/66), asociada a estas lesiones, similar a la prevalencia hallada en este estudio de 11.1% (3/27). En contraste con *González et al 2007*(3) donde no encontró presencia de VPH en estas lesiones hiperplásicas reactivas.

La asociación entre VPH cáncer oral aún no es claro, por tanto los estudios moleculares se están dirigiendo en las diferentes alteraciones que puedan ayudar

a esclarecer su participación en especial los VPH oncogénicos. En cuanto al Liquef Plano de mucosa oral, considerada por la OMS como una lesión potencialmente maligna, con un rango transformación de 0.3% a 10%, en este estudio se encontró una presencia de 50% (1/2) entre dos casos de Liquef Plano o 1% (1/106) , similar a estudios realizados por *Sugiyama et al 2003*(124) (65%) y superiores a la prevalencia encontrada por *González et al 2007* y *Beijing Da, 2016* (por Hibridación *in situ*), quienes encontraron 10% y 12.3% respectivamente. (3)(40)

7.4. PRESENCIA DE VPH EN CÁNCER

En cuanto al cáncer oral (CO), es importante resaltar que ésta neoplasia ocupa el séptimo lugar de frecuencia de todos los tipos de cáncer en el mundo, afecta sobre todo a hombres. El 75% de los casos se detectan alrededor de los 60 años y el 90% corresponden la Carcinoma Escamocelular Oral (CEC). En Pakistán, Sri Lanka e India, la incidencia de CO es muy alta. En países europeos como en el Reino Unido y Francia la incidencia de CO es relativamente alta. En Suramérica, en países como Argentina, Uruguay y Brasil estas tasas van en aumento.(1)

El genotipo de VPH predominante en cáncer orofaríngeo es el VPH-16; prevalece principalmente en la orofaringe (35,6 %), cavidad oral (23,5 %) y en la laringe (24,0%)(125). Un reciente meta- análisis ha confirmado que el VPH es un factor de riesgo independiente para CO. Muchos estudios han confirmado la presencia VPH-16 en CO, como *Rettig M et al 2015* y *D'Souza et al 2011* (126) (127), quienes detectaron en 54% y 56.8% respectivamente (67/124 y 66/116) .En este estudio se detectó 1 entre 39 casos de CO , que representa el 2.6 % . Esta infección se encontró en un paciente hombre fumador de 83 años (1/39), ubicado en labio inferior. Resultados similares a los registrados por *Matzow et al, 1998* quienes hallaron 1 caso VPH -16 positivo de 38 cánceres orales (28). Estos resultados permiten sugerir futuros estudios que busquen la presencia de otros

genotipos de VPH de alto riesgo empleando varias técnicas y – cebadores para detectar otros genes.

En este estudio se realizó adicionalmente la determinación del gen *E6* del VPH-16, en 37 muestras de las 66 de CO de este estudio, donde se halló la prevalencia de *E6* en 24.3% (9/37), (datos próximos a publicar). *González, 2007*(3), encontró en tres de siete casos infección mixta de VPH11 y VPH16 y ninguno con VPH16. La ausencia de VPH16 en estos estudios podrían ser debido a la presencia de otros tipos de VPH oncogénicos, por estar asociados a otras etiologías diferentes a la infección por VPH, o por una carga viral muy baja que es indetectable por las técnicas empleadas en el laboratorio (Giovannelli et al 2002)(128).

7.5. DISTRIBUCIÓN TOPOGRÁFICA DE LESIONES CON DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE VPH

Los estudios que describen la ubicación en cavidad oral de lesiones sugestivas de VPH son escasos. Identificar la presencia de VPH-16 es de vital importancia, por su potencial oncogénico e imperceptible. En éste estudio se analizaron 106 muestras orales β -globina Positivas, de las cuales a 12,2% del total de las muestras (13/106) se les detectó VPH-16.

El análisis topográfico de las lesiones en ésta cohorte demostró que los Papilomas, se desarrollan en toda la cavidad oral, principalmente en paladar blando 14 (28%), Hiperplasias en zona de carrillo 15 (22.4%) y rebordes alveolares 14 (20.9%). Posiblemente esto se deba a que son áreas anatómicamente con mayor fricción o traumatismo; los condilomas se encontraron con más frecuencia en lengua 5 (50 %), mientras que Liquen fué mayor en paladar 2 (50%) y el lugar de mayor frecuencia de Carcinoma Escamocelular fue lengua 24 (36. %) y orofaringe 18 (27.3%) ver Tabla 14.

Estudios como el realizado por *Jiménez*, 2001(100) reporta una proporción de Papiloma Bucal de 50% (11/22) en mucosa labial y lengua y un 36,36% (8/22) de Hiperplasia Epitelial Focal en labios y carrillos, como las lesiones más frecuentes. Registros hechos por *Mravak Marinka et al* 2013(116), quienes refieren que las lesiones con VPH + se encuentran mayormente en borde bermellón, paladar duro, mucosa labial y comisuras labiales. Igualmente, al analizar la presencia de la infección por VPH-16 en la cavidad oral por sitio topográfico en este estudio (labio inferior 11.8% (2/17), lengua 4.0%(2/50), carrillo 6.7%(2/30), paladar 5.6%(2/36), reborde alveolar 5.3%(1/19) y otros sitios anatómicos orales 6.1%(4/33), se detectó que la infección está presente en gran parte de la cavidad oral (75%), datos similares a estudios realizados por *Gonzales et al*(3) y *Mravak Marinka et al.*(116) Esta prevalencia del virus debe esclarecerse como potencial factor de riesgo transformante en cavidad oral.

En relación con lesiones positivas para VPH de 106 lesiones con β -globina positivas, en éste estudio se detectó un total de 13 lesiones que presentaron ADN de VPH16, distribuidas así: Papilomas (23%) 6/26, siendo la lesión más predominante, Condilomas 2 (29.6%)2/7. Hiperplasias (11.1%) 3/27, las cuales incluyen Hiperplasia pseudoepiteliomatosa, Hiperplasia Epitelial con Hiperqueratosis e hiperplasia epitelial con hiperqueratosis y displasia epitelial moderada; Liquen Plano 1 (50%)1/2; Carcinoma Escamocelular 1 (2.56%) 1/39. El caso de Carcinoma Escamocelular se presentó en un hombre mayor de 70 años.

En este estudio los rangos de edad más relevantes en las lesiones orales con VPH se presentaron se presentaron entre 31-50 años (30.8%) 4 lesiones y mayores de 70 años, 4 lesiones (30.8%). El virus del Papiloma Humano suele afectar ambos géneros, a cualquier edad, pero la infección alcanza su mayor incidencia, entre la tercera y quinta década de vida. Criterios como los de *Estrada GA y col* 2015(58) consideran que las practicas orales sexuales a temprana edad

pueden ser influyentes en la aparición de las lesiones orales al presentar mayor frecuencia en población adulta.

7.6. CORRELACIÓN DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO SUGESTIVO DE VPH CON EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Con relación al diagnóstico histopatológico sugestivo de VPH y resultados moleculares se observó asociación (IC: 0.1-11.7; $p=0.01$) lo que permite considerar que la presencia y observación de características histopatológicas (Hiperplasia, coilocitosis, hiperqueratosis) pueden indicar la posibilidad de infección de tipo viral en este caso la existencia de VPH de alto riesgo. De igual forma, se encontró asociación entre las lesiones verrugosopapilares y la infección por VPH ($p=0.023$). Lo que indica que las lesiones verrugoso papilares pueden asociarse con presencia viral.

En el análisis de las características histopatológicas asociadas a VPH, se observó que la característica más frecuente para lesiones orales fue la presencia de coilocitos entre la capa espinosa y basal (75%), con núcleo delgado, granuloso y visualización de citoplasma (50%) la queratina se presenta en la mayoría de los casos. Con relación a los cambios estructurales y celulares, se observó un predominio de cambios displásicos leves e incipientes y presencia de células mitosoidales (37.5% y 37.5%). Además se observaron dos casos (25%) de displasia moderada. El infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en su mayoría fue leve (37.5%). Finalmente en once lesiones (11/13) se conservó la membrana basal. En una lesión benigna se observó pérdida de la membrana basal en una pequeña zona (1/13).

La literatura relaciona a las células mitosoidales como un signo patognómico o característico de la enfermedad de HECK, lesión caracterizada por elevaciones

blandas sésiles, ubicadas frecuente o principalmente en labio y áreas de carrillo y lengua. La población con mayor predisposición a estas lesiones es la población indígena (129). Es importante aclarar que en este estudio no se incluyeron, pero sí se observó la presencia de éstas células en lesiones con diagnósticos de papiloma y condilomas (ver fig. 19 y 20) La caracterización histopatológica presentada es la descrita por la literatura, sin observar cambios que determinaran una condición de especificidad por la presencia de VPH16.

Se encontraron que éstas células que exhiben cariorexis, se observan también en verrugas orales y condilomas no displásicos, asociados a efectos citopáticos por infección de VPH (Woo S *et al*,2013) y aunque aún no está muy claro los mecanismos de su alteración, se le ha encontrado positivo para biomarcador tumoral Ki67 (130). Estas descripciones estructurales y citopáticas deben ser llevadas a estudios de más sensibilidad que permitan determinar el efecto del VPH en los viriones de los queratinocitos.

8. CONCLUSIONES

- La presente investigación permitió detectar la presencia del virus del papiloma humano tipo 16 en mucosa sana y en diferentes lesiones benignas verrugosopapilares , precursoras de cáncer y malignas de la cavidad oral en una población colombiana
- Se presentó asociación de práctica de sexo oral en infección por VPH 16 en mucosa sana en población de estudio, predominando las edades entre 15 y 18 años.
- La topografía más relevante de expresiones orales fueron lengua, labio inferior paladar y carrillo consideradas zonas de mayor exposición al microtrauma.

9. PROSPECTIVAS

- Determinar la presencia de más genotipos oncogénicos de VPH en estudios de carácter multicéntrico para fortalecer el conocimiento de la etiopatogenia de la infección por VPH y su relación con lesiones pre malignas y malignas de la cavidad oral al igual que en mucosa sana, en el entorno colombiano.
- Realizar secuenciación del material negativo para VPH16 en productos de PCR de éste estudio para detectar la presencia otros genotipos de VPH.
- Realizar campañas educativas de promoción y prevención acerca de la Infección por VPH oral.

BIBLIOGRAFIA

1. Iarc. IA for R on CWHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Globocan [Internet]. 2012;1–6. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?
2. Pardo, C. Cendales R. Incidencia, mortalidad y prevalencia de Cáncer en Colombia 2007-2011. Vol. 1, Instituto Nacional De Cancerologia. 2015. 148 p.
3. Gónzalez J V., Gutiérrez RA, Keszler A, Colacino MDC, Alonio L V., Teyssie AR, et al. Virus papiloma humano en lesiones orales. Med (Buenos Aires). 2007;67(4):363–8.
4. Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. Head Neck Oncol. 2010;2(1):24–6.
5. de Guglielmo Z, Ávila M, Veitía D, Fernandes A, Venegas C, de Plata CM. Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2012;35(3):445–54. Available from: scielo.isciii.es/pdf/asisna/v35n3/original9.pdf
6. Mancilla LI, Aristizabal D, Acevedo SM. Infección con papilomavirus humano tipo 16 en mucosa normal de cavidad oral en una población de la ciudad de Cali en 2011. 2012;1(2):11–20.
7. Ortiz A; Ortiz S; Mancilla L; Aristizabal D. Prevalencia del VPH en lesiones Precursoras de cáncer en cavidad oral en tres IPS de Cali. Cali, Colombia; 2012. p. 90.
8. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893–917.
9. Stambuk HE, Karimi S, Lee N, Patel SG. Oral Cavity and Oropharynx Tumors. Vol. 45, Radiologic Clinics of North America. 2007. p. 1–20.

10. Phillip J. Patología oral y maxilofacial contemporánea. Vol. Segunda ed, Editorial Elsevier. 2004. 81-87 p.
11. de Souza LN, de Brito AA, de Souza ACRA, Gomez RS, da Costa Reis PM, Alvarenga RL. Carcinoma escamocelular bucal diagnosticado precozmente. Rev Cubana Estomatol. 2010;47(3):347–54.
12. Cawson RA. Fundamentos de medicina y patología oral, 8a ed. Elsevier, editor. España; 2009. 484 páginas.
13. American Cancer Society. Cáncer de orofaringe y de cavidad oral [Internet]. 2014. Available from: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeorofaringeydecavidadoral/guiadetallada/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer>
14. Mehanna H, Paleri V, West CML, Nutting C. Head and neck cancer-Part 1: Epidemiology, presentation, and preservation. Vol. 36, Clinical Otolaryngology. 2011. p. 65–8.
15. Ordoñez D, Aragon N, García LS, Collazos P, Bravo LE. Cancer oral en Santiago de Cali, Colombia: Análisis poblacional de la tendencia de incidencia y mortalidad. Salud Publica Mex. 2014;56(5):465–72.
16. Herrero R. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. CancerSpectrum Knowl Environ [Internet]. 2003;95(23):1772–83. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/95/23/1772.long>
17. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, et al. High Association of Human Papillomavirus Infection with Oral Cancer: A Case-Control Study. Arch Med Res. 2008;39(2):189–97.
18. Cardemil M F. Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Rev Chil cirugía [Internet]. 2014;66(6):614–20. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-40262014000600017&lng=es&nrm=iso&tlng=es

19. Yousif Babiker A, Margani Eltom F, Abdalaziz MS, Rahmani A, Abusail S, Gadelkareem Ahmed H. Screening for high risk human papilloma virus (HR-HPV) subtypes, among sudanese patients with oral lesions. *Int J Clin Exp Med*. 2013;6(4):275–81.
20. Bagan J V., Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: Epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol*. 2008;44(2):103–8.
21. León Cruz G, Faxas ME. Cáncer de cuello uterino: Aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. Vol. 43, *Revista Cubana de Medicina*. 2004.
22. Pöschl G, Stickel F, Wang XD, Seitz HK. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proc Nutr Soc*. 2004;63:65–71.
23. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 1999;49(2):1,33–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10200776
24. Kingsley K, O'Malley S, Ditmyer M, Chino M. Analysis of oral cancer epidemiology in the US reveals state-specific trends: implications for oral cancer prevention. *BMC Public Health* [Internet]. 2008;8:87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2287178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Sciubba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc*. 2001;132 Suppl:12S – 18S.
26. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Bmj*. 2002;(January).
27. Elba R, Aguilar B, Campos JB. Artículo de revisión Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatologia Rev Mex*. 2009;53(5):234–43.

28. Matzow T, Boysen M, Kalantari M, Johansson B, Hagmar B. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol* [Internet]. 1998;37(1):73–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572657>
29. Alvarez Gómez GJ, Alvarez Martínez E, Jiménez Gómez R, Mosquera Silva Y, Gaviria Núñez AM, Garcés Agudelo A, et al. Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Department of Sucre, Colombia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(1):1–8.
30. Orozco P, Vásquez S, Venegas B, Rivera C. Prevalencia de queilitis actínica en trabajadores expuestos a radiación ultravioleta en Talca, Chile. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral* [Internet]. 2013;6(3):127–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0718539113701356>
31. Pindborg JJ, Reichart P a., Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization: Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. Second Edition. Vol. 2, Springer-Verlag. 1997.
32. Huang S-H, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2013;18(2):e233–40. Available from: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv18_i2_p233.pdf \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3613874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Zárate CE. La nueva clasificación de la O. M. S. 2005. Lesiones precursoras y los tumores de la laringe, hipofaringe y tráquea. *Rev Esp Patol*. 2007;40(2005):3–10.
34. Aguas HE;Tizeira T. Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. Argentina; 2004. p. Vol. 19,Pág 1–64.
35. Lobos Jaimes FN. Patología de la Mucosa Oral [Internet]. 2008. Available from: www.medicinaoral.cl/html/pdf/patologia_mucosa.

36. Castro ZB, Pérez IIR, Miranda IJD, Calzado IER, Teresita II, Obaya R, et al. Relación histopatológica de la displasia epitelial con la oncoproteína p53 en la leucoplasia bucal Histopathological relation of epithelial dysplasia to p53 oncoprotein in oral leukoplakia. 2012;49(1):20–9.
37. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod [Internet]. 2001;91(6):622–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ebd.6400171> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402272>
38. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. Head Neck Oncol. 2009;1:22.
39. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (Review). Vol. 30, International Journal of Oncology. 2007. p. 813–23.
40. Beijing Da;Cao J, Jin JQ, Deng D LH. Human papillomavirus in oral leukoplakia,oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. PubMed - Index Medlin. 2016;48(1):84–8.
41. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod [Internet]. 2011;112(3):328–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.04.009>
42. Montejo M, Santos-juanés J, Romero MC. Lesiones cupuliformes en la mucosa oral. 2006;65(6):2005–6.
43. Flores JL Strauss M. Papilomas orales: un análisis clínico en pacientes que acuden a la clínica Odontológica Univalle-La Paz. Rev Inv e Info Salud. 2010;5(12):15–24.

44. González L V., Gaviria AM, Sanclemente G, Rady P, Tying SK, Carlos R, et al. Clinical, histopathological and virological findings in patients with focal epithelial hyperplasia from Colombia. *Int J Dermatol*. 2005;44(4):274–9.
45. Papules F, Pruebas YA. Pápulas planas labiales en un adulto joven. 2016;101(9):799–800.
46. Costa LJ, Silveira FR, Batista JM, Birman EG. Human papilloma virus--its association with epithelial proliferative lesions. Vol. 5, *Brazilian dental journal*. 1994. p. 5–10.
47. Bermeo-Escalona JR, Gonzalez-López BS, Ramírez-Gallegos E, Mendieta-Zeron H. Effectiveness of Toki's criteria and determination of variables for identification of HPV L1 protein in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(6):e538–44.
48. Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Happonen R-P, Lamberg MA. In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosal lesions. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 1987;279(8):543–9. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023499485&partnerID=40&md5=ab6cb436446c491a167b322cca86400e>
49. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* [Internet]. 2005;32 Suppl 1:S59–66. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653204003634>
50. Toki T YA. PV score", a scoring system for histological diagnosis of human papillomavirus infection in dysplasia of the uterine cervix. *Acta Pathol Jpn*. 1987;Mar;37(3):449–55.
51. Berkovitz B, Holland G. R. MBJ. Atlas en color y texto de anatomía oral, histología y embriología No Title. segunda ed. Mosby, editor. 1995. 328 páginas.
52. Gómez de Ferraris ME CMA. Histología y embriología bucodental. 2da edició. Panamericana EM, editor. 2002. 482 páginas.

53. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Perino A, Panzarella V, Ammatuna P, et al. Low rate of oral human papillomavirus (HPV) infection in women screened for cervical HPV infection in Southern Italy: A cross-sectional study of 140 immunocompetent subjects. *J Med Virol*. 2009;81(8):1438–43.
54. Esquenazi D, Filho IB, Carvalho M da G da C, de Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(1):78–84.
55. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370(9590):890–907.
56. Acheson N. *Fundamentals of Molecular Virology*. 2nd Editio. Wiley-Blackwell, editor. 2011.
57. García-Cuellar CM, González-Ramírez IDC, Granados-García M. VPH y los Carcinomas de Cavidad Bucal y Bucofaringe. *Cancerol Rev del Inst Nac Cancerol* [Internet]. 2009;30(22):181–91. Available from: <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1272302362.pdf>
58. Estrada-Pereira GA, Márquez-Filiu M, González-Heredia E, Nápoles-Pruna MM, Ramón-Jiménez R. ARTÍCULO ORIGINAL Infección por virus del papiloma humano en la cavidad bucal. *Medisan*. 2015;19(3):300–6.
59. Burchell AN, Winer RL, de Sanjos?? S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24(SUPPL. 3).
60. Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. (Cover story). *J Am Dent Assoc* [Internet]. 2011;142(8):905–14. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=65390119&site=ehost-live>
61. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vol. 30, *Vaccine*. 2012.

62. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: Infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *Apmis*. 2010;118(6-7):471–93.
63. Nekulova M, Holcakova J, Nenutil R, Stratmann R, Bouchalova P, Müller P, et al. Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. *Virchows Arch*. 2013;463(3):415–25.
64. Mancilla L, Carrascal E, Gheith T, Tamayo O, García F TM. Efecto de la integración del ADN de papilomavirus humano en carcinoma tracto respiratorio y digestivo superiores. 2012;1(1):11–8.
65. Hopman, A. H.N., Kamps, M. A., Smedts, F., Speel, E.-J. M., Herrington CS and R. HPV in situ hybridization: Impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer*. 2005;115:419–4.
66. Sanabria Negrín JG. Virus del Papiloma humano. *Rev Ciencias Médicas Pinar del Río*. 2009;3(4):168–87.
67. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. [Internet]. Vol. 20, *Acta cytologica*. 1976. p. 505–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1069445>
68. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(3):946–54.
69. Cavazza M, Correnti M. Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. *Dermatología Venez*. 2004;42(3).
70. Mehra R , Serebriiskii I , Dunbrack Jr. RL, Robinson M BBDRU. Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR- and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancerNo Title. *Drug Resist Updat*. 2011;14(6):260–79.

71. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids 2 . High-Sensitivity Microvolume Nucleic Acid Quantitation Using the NanoDrop 3300. 2010;(November):1–4.
72. Scully C, Bagan J V. Recent advances in Oral Oncology. Vol. 43, Oral Oncology. 2007. p. 107–15.
73. Peña González A, Arredondo López M, Vila Martínez L. Clinical and epidemiologic behavior of oral cancer. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2006;43. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v43n1/est03106.pdf>
74. American Cancer Society, Society AC. Breast cancer facts & figures. Am Cancer Soc. 2010;8(2):1–34.
75. de Guglielmo Z, Ávila M, Veitía D, Fernandes A, Venegas C, de Plata CM. Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. An Sist Sanit Navar. 2012;35(3):445–54.
76. [Www.patología.univalle.edu.co](http://www.patología.univalle.edu.co). Universidad del Valle. Colombia.
77. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J. 2007;18(2):148–52.
78. Chan PK, Chan DP, To KF, Yu MY, Cheung JL, Cheng a F. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. J Clin Pathol [Internet]. 2001;54(5):401–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1731425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
79. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (80-). 1985;230(4732):1350–4.
80. Thermo Scientific. Nanodrop products. <http://www.nanodrop.com/>.

81. Baay MFD, Quint WG V, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MPM, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):745–7.
82. Lizard G, Chignol MC, Chardonnet Y, Souchier C, Bordes M, Schmitt D, et al. Detection of human papillomavirus DNA in CaSki and HeLa cells by fluorescent in situ hybridization. Analysis by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. *J Immunol Methods.* 1993;157(1-2):31–8.
83. Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *J Am Dent Assoc [Internet].* 2011;142(8):905–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804057>
84. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology [Internet].* 2011;414(2):153–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.019>
85. Caruso S, Agnello C, Malandrino C, Lo Presti L, Cicero C, Cianci S. Do Hormones Influence Women's Sex? Sexual Activity over the Menstrual Cycle. *J Sex Med.* 2014;11(1):211–21.
86. Hernández-Carreño L, Padilla-Loredo S, Quintero-Soto ML. Factores de riesgo en adolescentes para contraer el virus del papiloma humano. *Rev Digit Univ [Internet].* 2012;13(9):1–16. Available from: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num9/art96/art96.pdf>
87. Berrington A, Jha P, Peto J, Green J, Hermon C. Oral contraceptives and cervical cancer. *Lancet [Internet].* 2002;360(9330):410. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24469243>
88. Ceballos CW, Peñaloza JA, del Castillo AD, Murillo ST, Fidalgo HS. Efectos psicológicos y sociales que genera la prueba del virus del papiloma humano: un estudio exploratorio. *Rev Colomb Cancerol [Internet].* 2009;13(3):145–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123901509701337>

89. Davlin SL, Berenson AB, Rahman M. Correlates of HPV Knowledge among Low-income Minority Mothers with a Child 9-17 Years of Age. *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2015;28(1):19–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2014.01.109>
90. Tristão W, Ribeiro RMP, de Oliveira CA, Betiol JC, Bettini J de SR. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(4):66–70.
91. Ruiz G, Ojeda P, Di Giampietro L. Determinación del VPH en cavidad oral: Por técnica del hisopo. *Rev Venez Oncol*. 2009;21(2):70–6.
92. Ball Elizabeth. Virus Papiloma Humano. *Biología molecular, genética y mecanismos oncogénicos*. *Dermatol Venez*. 1998;36(4):136–41.
93. Giraldo P, Gonçalves AKS, Pereira SAS, Barros-Mazon S, Gondo ML, Witkin SS. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;126(1):104–6.
94. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(4):201–5.
95. Syrjanen K, Hakama M, Saarikoski S, Vayrynen M, Yliskoski M, Syrjanen S, et al. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis*. 1990;17(1):15–9.
96. Augusto O, Solórzano T, Manuel J, Camacho S, Luis J, Velásquez L, et al. Nivel de evidencia III Ectropión cervical: factor de riesgo para lesiones precursoras y cáncer cervico uterino . 2014;(11).
97. Lee YCA, Hashibe M. Tobacco, alcohol, and cancer in low and high income countries. *Ann Glob Heal* [Internet]. 2014;80(5):378–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.010>

98. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. JAMA [Internet]. 2012;307(7):693–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282321>
99. Nayak S, Chandra S, Mehrotra D, Kumar S, Agrawal SP, Kumar S, et al. Effect of tobacco, alcohol, and smoking habits in oral precancer with histological proven epithelial dysplasia. J Oral Biol Craniofacial Res [Internet]. 2012;2(3):159–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212426812000590>
100. Jiménez C. PC. Estudio clínico-patológico retrospectivo de papiloma de la mucosa bucal en una población venezolanao Title. Acta Odontol Venez. 2002;40(1):31–5.
101. Gayet C, Juárez F, Pedrosa LA, Magis C. Uso del condón entre adolescentes mexicanos para la prevención de las infecciones de transmisión sexual. Salud Publica Mex [Internet]. 2003;45:S632–40. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0036-36342003001100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es\ninternal-pdf://15/scielo.html
102. Melo G WS. No El virus del papiloma humano.(Condilomas)Title. Rev Divulg científica y tecnológica la Univ veracruzana. 2009;
103. Osazuwa-Peters N, Wang DD, Namin A, John VM, O'Neill M, Patel P V., et al. Sexual behavior, HPV knowledge, and association with head and neck cancer among a high-risk group. Oral Oncol [Internet]. 2015;51(5):452–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.01.011>
104. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat. 2011;20(3):161–73.
105. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. J Infect Dis. 2009;199(9):1263–9.

106. Mosher WD, Chandra A, Jones J. Sexual behavior and selected health measures: men and women 15-44 years of age, United States, 2002. *Adv Data*. 2005;(362):1–55.
107. Sánchez-Vargas LO, Díaz-Hernández C, Martínez-Martínez A. Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2010;5(1):25. Available from: <http://www.infectagentscancer.com/content/5/1/25>
108. Beachler DC, D'Souza G. Natural history of oral papillomavirus infection in men. *Lancet* [Internet]. 2013;382(9895):839–41. Available from: <http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS0140-6736%2813%2961123-X/fulltext>
109. Castellsagué X, Ghaffari a, Daniel RW, Bosch FX, Muñoz N, Shah K V. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis* [Internet]. 1997;176(2):353–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237700>
110. Aranda D. E, López Manuel , Leyva L.A DRM. No Title Condiloma acuminado en adolescentes y adultos jóvenes del área de salud “Tula Aguilera” en el municipio de Camagüey [Internet]. Available from: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol17_8_13/san11178.htm
111. Leigh BC, Temple MT, Trocki KF. The sexual behavior of US adults: Results from a national survey. *Am J Public Health*. 1993;83(10):1400–8.
112. Dahlstrom KR, Bell D, Hanby D, Li G, Wang LE, Wei Q, et al. Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. *Oral Oncol* [Internet]. 2015;51(9):832–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.005>

113. Escalona L., Correnti M, Veitía D PM. Detection of Human Papillomavirus in gingival fluid of Venezuelan HIV patients with periodontal diseaseNo Title. Invest Clin [Internet]. 2011;52(3):207. Available from: <http://www.redalyc.org/html/3729/372937685002/>
114. Tezal M. Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. Int J Otolaryngol. 2012;2012(Table 1):1–9.
115. Jalal H, Sanders CM, Prime SS, Scully C, Maitland NJ. Detection of human papilloma virus type 16 DNA in oral squames from normal young adults. J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol. 1992;21(10):465–70.
116. Mravak-Stipetić M, Sabol I, Kranjčić J, Knežević M, Grce M. Human Papillomavirus in the Lesions of the Oral Mucosa According to Topography. PLoS One. 2013;8(7).
117. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. Lab Invest. 1994;71(4):604–11.
118. Flake C, Arafa J, Hall A, Ence E, Howard K, Kingsley K. Screening and detection of human papillomavirus (HPV) high-risk strains HPV16 and HPV18 in saliva samples from subjects under 18 years old in Nevada: a pilot study. BMC Oral Health [Internet]. 2012;12(1):43. Available from: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=CitingArticles&qid=14&SID=V2VtwdaYWiEY43iMGKp&page=1&doc=5
119. Turner DO, Williams-Cocks SJ, Bullen R, Catmull J, Falk J, Martin D, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) screening and detection in healthy patient saliva samples: a pilot study. BMC Oral Health [Internet]. 2011;11(1):28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3200164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

120. Aguirre R, Tapia A, Fernández A. Prevalence and risk factors for HPV infection in normal oral mucosa of Chilean dentistry students. *J Oral ...* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.joralres.com/index.php/JOR/article/view/206>
121. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis a, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*. 2000;13(6):644–53.
122. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin cancer Res*. 2001;7(12):3988–93.
123. Al-Bakkal G, Ficarra G, McNeill K, Eversole LR, Sterrantino G, Birek C. Human papilloma virus type 16 E6 gene expression in oral exophytic epithelial lesions as detected by in situ rtPCR. In: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999. p. 197–208.
124. Sugiyama M, Bhawal Reino Unido, Domen T, Ono S, Miyauchi M IT. Detección de ADN del Virus Papiloma Humano Tipo 16 y 18 en epitelio bucal normal, displásico y maligno. *Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95 (5)(594-600.).
125. Eduardo S-G, Ronell Eduardo B-M, Alfredo N-R, Anderson RB. Prevalencia del VPH en el Proceso de Malignización de Lesiones de Vías Aérodigestivas Superiores. *Int J Odontostomatol* [Internet]. 2011;5(1):5–12. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2011000100001&lang=es
126. Rettig EM, Wentz A, Posner MR, Gross ND, Haddad RI, Gillison ML, et al. Prognostic Implication of Persistent Human Papillomavirus Type 16 DNA Detection in Oral Rinses for Human Papillomavirus–Related Oropharyngeal Carcinoma. *JAMA Oncol* [Internet]. 2015;21205(7):907–15. Available from: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2015>.

127. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, Haddad R, Anderson KS, Rajan S, et al. Oral Human Papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *J Clin Oncol*. 2014;32(23):2408–15.
128. Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;185(6):833–6. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34226212> \n <http://dx.doi.org/10.1086/339193>
129. Park M, Cho Y, Kim S, Myoung H, Lee J, Lee S. Focal epithelial hyperplasia arising after delivery of metal-ceramic fixed dental prosthesis. 2014;(03):555–8.
130. Woo S-B, Cashman EC, Lerman M a. Human papillomavirus-associated oral intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* [Internet]. 2013;26(10):1288–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23599160>

DIVULGACIÓN TEMÁTICA DEL PROYECTO

- Ponente: En la XIV Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal, realizado los días 29, 30 y 31 de Agosto 2016, en Lima Perú
- Ponente: En la XII Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal, realizado los días 13, 14 y 15 de Noviembre de 2014, en Santiago Chile
- Conferencista. Primer encuentro regional de investigación e innovación en odontología. USC – UNIVALLE – UNICOP. Agosto 30 de 2013 Santiago de Cali
- Congreso. 45 años escuela de odontología “lesiones en tejidos blandos”. UNIVALLE. Junio – 2015.
- Tutora. Trabajo de grado: Factores de riesgo asociados a infección por vph16 en mucosa oral sana de pacientes atendidos en una institución odontológica de Santiago de Cali en el año 2013. Trabajo ganador primero premio encuentro interno de semilleros USC. Abril 2015. Y participación encuentro departamental de semilleros de investigación en mayo de 2015

ANEXO

Anexo 1. POE 001 toma de muestras mucosa oral 1

 Universidad del Valle	EXTRACCION DE ADN EN CELULAS DE MUCOSA ORAL LIBRE DE LESION CLINICA		POE-TM-001
Unidad: LABORATORIO. UNIVERSIDAD DEL VALLE	Proceso: 02		
REVISADO POR: (Cargo) MERCEDES FIGUEROA Bacterióloga Candidata Doctorado Ciencias Biomédicas			Fecha de creación 19 02 15 aa mm dd
REVISADO POR:			Fecha de Aprobación 00 00 00 aa mm dd Fecha de Actualización 15 01 15 aa mm dd

- **Objetivo.**
 Obtener un extracto de ADN de muestras de células epiteliales por frotis de mucosa oral libre de lesión clínica.
- **Alcance.**
 Este procedimiento está dirigido a clínicos e investigadores que presenten la competencia para la toma de muestras en mucosa oral de sujetos humanos.
- **Autoridad y Responsabilidad.**
 La autoridad para este documento es del director del proyecto de investigación de la propuesta de la estudiante Dolly Aristizàbal, Mg (E) . Y la responsabilidad de aplicar este protocolo es de la investigadora del proyecto. Una vez obtenida las muestras se aplicarán los protocolos empleados por Aidar y Line (2007), modificada por Mancilla 2012

- **Definiciones.**

Se manejan principios básicos de normatividad en bioseguridad y transporte de muestras desde la clínica odontológica que minimicen errores en los análisis y efectos en las misma.

5. Requerimiento de Recursos

5.1 Tubos de Eppendorf rotulados con un código de identificación.

5.1.1 base de datos de control de cada código de identificación.

5.2 Materiales

5.2.1 Gradillas para tubos eppendorf de 1.5 ml

5.2.2 Tubos eppendorf de 1.5 ml.

5.2.3 Hisopos de algodón.

5.2.5 espejos bucales estériles

5.2.9 Equipo de bioseguridad: Guantes, tapabocas, gorro y blusa desechables.

5.3 Equipos

5.3.1 baño María marca (¿???)

Centrifuga

Nevera fija y portátil

5.3 Reactivos y soluciones.

Proteinasa K

Acetato de amonio (AcNH_4)

EDTA 1mM

5.4.2 Preparación.

5.4.2.1 Para determinar el **Buffer de Lisis** requerido para la extracción del DNA de este estudio se tiene:

Reactivo	Concentración Final	Stock []	Volumen de uso. Para prepara 150 ml	
Tris HCL	10mM	0.5M a pH= 8	30 ml (pero se prepara 50ml)	
SDS	0.5%	10%	7.5 ml	
NaCl	0.05 M=50mM	0.5 M	2.5 ml (2500µl)	

Con un volumen final para las concentraciones del estudio es de 150 ml.

STOCK	CONCENTRACION (g)	AGUA	VOLUME N FINAL	[concentración en M]
Tris HCL 10mM	3 g	Después de ajustar pH con HCl 12N, agregar agua hasta 50ml.	50 ml	0.5 M
SDS 0.5%	10 g	Agregar agua hasta vol. final	100 ml	10%
NaCl 0.05 M=50mM	1.46 g	Agregar agua hasta vol. final	50 ml	0.5 M

SOLUCION DE STOCK DEL Tris HCL

Para hacer preparaciones de stock se emplea un volumen 10 veces mayor que lo que requiere el protocolo a seguir.	
Se prepara primero el Tris, se coloca en un pH metro y se le va agregando HCl hasta alcanzar pH 8.	
Se realizan las preparaciones en un volumen 1 litro.	
PM (Tris)= 121.14 gm/mol V1= 150ml (volumen total del Buffer de lisis) C1= 10mM C2 =? V2= 1 L= 1000ml C1x V1 = C2 x V2 C2 =C1xV1/V2 C2= 150ml x 10mM /1000ml C2= 1.5 gr. Para 1M de Tris Si se prepara 0.5 M serian 1.5 x 2 = 3 gms.	Otra manera es: En un volumen de 50ml que se requiere para la solución de Tris HCl a pH=8; 0.5M V1= 50ml PM =121.14.-.- como son [0.5M] entonces seria 60.57 gm 0.5 M 1 M --- 121.14 gm/mol 0.5 M --- X X= 60.57gm/mol Entonces se tiene que para 1 litro de agua, se requiere 60.57 gms de Tris a 0.5M. Ahora se calcula para 50ml 60.57 gm .-.-.-. 1.000ml X .-.-.-. 50ml X= 3.02gms
O también PM * M * V 121.14 gm/mol * 0.5M * 0.05 Lts = 3.02 gms/ Lts	Entonces: Se le agrega 30 ml de agua destilada a 3.02 gms de Tris se cuadra el pH agregando HCl y luego se completa a 50ml
SOLUCIÓN DE STOCK PARA SDS el SDS es necesaria para eliminar las membranas. C1= 10 % C2= 0.5% V1= ¿? V2= 150 ml C1 x V1 = C2 x V2 V1= C2xV2/C1 (0.5%	

NaCl 0.5 M en 50ml V1= 50ml = 0.05L PM de NaCl= 58.48gm/mol C= 0.5 M PM * M * V 58.48 gm/mol * 0.5 M * 0.05 L = 1.46 gm. Se pesa 1.46 gm de NaCl se le agrega agua hasta lograr el volumen final de 50 ml.	de 150 ml de las muestras? C1= 3000 mM =3M V2= 150ml C2= 50ml V1=? V1 = (50ml x150ml)/3000mM V1= 2.5ml
--	---

Principios:

** El NaCl se recomienda no preparar en stock por cuanto la reacción convierte en grupos. Este se mezcla directamente.

** Se debe prepara un stock solución de almacenamiento, para generar una capacidad de toma de reactivos, evitando varianzas en las preparaciones

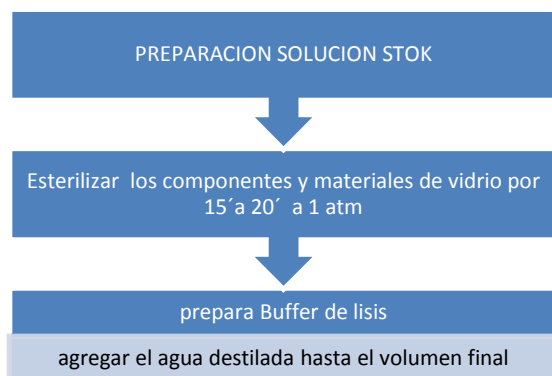
continuas y disminuir tiempos de trabajo, además de contaminación cruzada.

** Este debe realizarse una semana antes de comenzar el trabajo de laboratorio. Y esterilizar en autoclave de 15 a 20 minutos a 1 atm. de presión.

** Se pueden esterilizar todos juntos o separados y después se mezcla con agua estéril.

** El SDS se esteriliza solo, aparte, esteriliza con los demás compuestos y luego agrega agua destilada última del proceso. Entonces Tris HCl +

NaCl.-.-" . SDS.



5.4.2.1 Preparacion TE

5.4.3 Almacenamiento.

Las muestras por frotis de mucosa oral son estables a temperatura ambiente por 1 hora. Se deben transportar en nevera portátil hasta la nevera fija y almacenarlas y mantenerlas a 8°C hasta que sean procesadas.

5.6 Instrumento de evaluación.

Los participantes responderán una encuesta y sus datos serán registrados en un formato previamente aceptado por el director de la investigación. Ver anexo de encuesta

6. Desarrollo / Procedimiento

6.1 El proceso de captación de participantes.

6.2 Selección del participante con las condiciones requeridas para la inclusión: una mucosa oral, húmeda, color rosa coral, sin sintomatología y sin cambios en toda la estructura de la cavidad oral.

6.3 Se le indica al participante enjuagarse la boca con agua, para evitar restos alimenticios

6.3 La toma de la muestra se realiza en posición adecuada para el participante, en este caso la silla odontológica.

6.4 Se ubica el paciente utilizando la bioseguridad correspondiente

6.5 Se le solicita abrir la boca se realiza frotis con hisopo de algodón y de madera, fácil de doblar una vez que se repasa el instrumento por áreas de frenillo, mucosa bucal, encía y piso de boca.

6.6 Se utilizaran dos muestras por participante para manejar margen de error.

6.7 Se colocaran en un eppendorf con 1.5 de solución de lisis, previamente rotulado, se taparan con seguridad, se colocan en gradilla y se transportaran prontamente a nevera a una temperatura de 4°C. Hasta su manejo.

El buffer de lisis Se añade solución de lisis a 4°C, que solubiliza las membranas nucleares lo que permite liberación de los ácidos nucleicos. El detergente iónico dodecil sulfato de sodio, SDS, dispersa las lipoproteínas de las membranas y desnaturaliza complejos proteínicos. Además Las sales de la solución de lisis, neutralizan las cargas negativas lo que permite iniciar la precipitación de los ácidos nucleicos

7. Restricciones y limitaciones del procedimiento.

Las limitaciones son mínimas. Pero es importante que el participante presente una cavidad limpia, no haya comido recientemente, especialmente alimentos cremosos, achocolatados o adherentes a mucosa

8. Seguridad.

Se debe utilizar guantes, gafas, tapabocas y bata de laboratorio como protección. Los materiales que se utilicen deben ser estériles. Todo el procedimiento debe ser realizado con todas las medidas de bioseguridad.

9. Formatos de Registro.

9.1 Encuestas de evaluación

10. Documentos interrelacionados

10.1 POE-TM-002.

11. Bibliografía

Brenda Richards, Joel Skoletsky, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. Human Molecular Genetics. Vol. 2. No.2 159-163 .1993

Aidar, M. and S.R. Line, A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J, 2007. 18(2): p. 148-52

Anexo 2. POE 002 extracción ADN

 Universidad del Valle	EXTRACCION DE ADN EN CELULAS DE MUCOSA ORAL LIBRE DE LESION CLINICA		POE-TM-002
Unidad: PROCESOS DE LABORATORIO. UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI	Proceso: 02		
REVISADO POR: (Cargo) Lida Inés Mancilla E			Fecha de creación 19 02 15 aa mm dd
APROBADO POR: (Cargo)			Fecha de Aprobación 00 00 00 aa mm dd Fecha de Actualización 15 02 15 aa mm dd

- **Objetivo.**
Obtener un extracto de ADN de muestras de células epiteliales por frotis de mucosa oral libre de lesión clínica.
- **Alcance.**
Este procedimiento está dirigido a clínicos e investigadores que presenten la competencia para la toma de muestras en mucosa oral de sujetos humanos y el conocimiento de técnicas de laboratorio en biología molecular.
- **Autoridad y Responsabilidad.**
La autoridad para este documento es del director del proyecto de investigación de la propuesta de la estudiante Dolly Aristizábal G, Mg (E) . Y la responsabilidad de aplicar este protocolo es de la investigadora del proyecto. Una vez obtenida las muestras se aplicarán los protocolos empleados por Aidar y Line (2007), modificada por Mancilla 2012
- **Definiciones.**
La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido , otra etapa de degradación de la fracción protéica unida a ADN y otra etapa de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir con la técnica que permite como la PCR (Reacción en cadena de Polimerasa)

7. Requerimiento de Recursos

5.1 Tubos de Eppendorf rotulados con un código de identificación.

5.1.1 Cada muestras va soportada por registro individual del paciente con sus datos respectivos: Nombre, identificación, edad y adjunto a una encuesta como instrumento de estudio..

5.2 Materiales

5.2.1 Gradillas para tubos eppendorf de 1.5 ml

5.2.2 Tubos eppendorf de 1.5 ml.

5.2.3 Hisopos

5.2.5 Espejos bucales estériles

7.2.9 Equipo de bioseguridad: Guantes, tapabocas, gorro y blusa desechables.

5.3 Equipos

5.3.1 Baño María marca (¿???)

Centrifuga

Nevera fija

Refrigerador

7.3 Reactivos y soluciones.

Proteinasa K

Acetato de amonio (AcNH_4)

EDTA 1mM

Isopropanol

Etanol

TE

5.3.1 Identificación.

Identificación	Marca	Código
Proteinasa K	GoTaq Flexi DNA polimerasa 500 U	M8295
EDTA (sal Sódica) 100mg	Promega Promega	H5152

5.4.2 Preparación de soluciones

SOLUCION DE TRABAJO DE ACETATO DE AMONIO.(CH₃COONH₄)

La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.

Determinar cuanto debo pesar para preparar 50 mL de Acetato de amonio a 8M

PM Ac.amonio. =77.08 g/mol.

Vol. =10 ml = 0.01 L

C= 8 M (segun el protocolo)

$$PM * M * V$$

$$77.08 * 8 * 0.01 = 6.22 \text{ gm.}$$

$$\frac{\text{gm}}{\text{mol}} \quad \text{M} \quad \text{Lts}$$

** Se mezclan 6.22gms a un vol. de 10ml de agua destilada.

SOLUCION DE TRABAJO DE PROTEINASA K.

Es una enzima proteolítica que es purificada del hongo <i>Tritirachium album</i>	En solución estable en un rango de pH de 4.0 a 12.5 con un óptimo en 8.08 a una temperatura de 25°C a 65°C	es estable (al menos durante 20°C)
Aun cuando esta enzima tiene dos sitios de unión para el Ca ²⁺ , en la ausencia de este catión divalente, retiene suficiente actividad catalítica para degradar proteínas que generalmente se encuentran en las preparaciones de ácidos nucleicos.	La Proteinasa K se prepara en una solución stock de 20 mg/2ml lo que equivale a 10mg/ml en agua estéril y se usa frecuentemente una concentración de trabajo o solución de trabajo de 50 µg/ml en un buffer Tris-HCl 10 mM, a un pH de 7.5, EDTA a 5mM y SDS al 0.5%	La actividad máxima de la Pr depende de calcio. maneja una concentración de

LA PREPARACIÓN DE BUFFER TRIS 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1)

Es una solución amortiguadora del Ph, proteger al DNA o RNA compone de TRIS 10Mm Da La capacidad amortiguadora del buffer , El pH del buffer es ajustado con HCl: dependiendo del tipo de ácido nucleico, óptimo para RNA de 7.5. para el DNA de 8.0.EDTA 1Mm Responsable de proteger a los ácidos nucleicos inactivando a las DNAsas o RNAsas actuando como quelante de cationes divalentes como el Ca2+ y el Mg2+ los cuales son indispensables para el funcionamiento de las enzimas

Tabla de preparación:

	CTIX	5ml	10ml	50ml	100ml	250ml	500ml	1000ml
1M TrisHCl	10 mM	50 µl	100 µl	500 µl	1 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml
0.5M EDTA	1 mM	10 µl	20 µl	100 µl	0.2 ml	0.5 ml	1 ml	2 ml
dH ₂ O		4.94 ml	9.88 ml	49.4 ml	98.8 ml	247 ml	494 ml	988 ml

SOLUCION DE STOCK DE EDTA.

Determinar cuánto debo pesar para preparar 50 ml de EDTA al 0.5M. a pH8 con NaOH.

PM EDTA =372.26 gm/mol.

Vol. = 50 ml = 0.05 L

C= 0.5 M

$$PM * M * V$$

$$372.26 \text{ gm/mol} * 0.5 \text{ M} * 0.05 \text{ L} = 9.30 \text{ gm}$$

Se mezclan 9.30 gms a un vol. de 30ml de agua destilada se le va agregando perlas de NaOH, se coloca en el pHmetro, hasta alcanzar pH8 y luego se completa hasta lograr 50 ml

SOLUCION DE TRABAJO DE Tris Hcl

En un volumen de 50 ml prepara la solución de Tris HCl a pH=7.5; 1M

V1= 50ml

PM =121.14gm/mol

C2= 1 M

C1=?

$$PM * M * V$$

$$121.14 \text{ gm/mol} * 1 \text{ M} * 0.05 \text{ Lts} = 6 \text{ gms}$$

Entonces: Se le agrega 6 gms a 30 ml de agua destilada de Tris se cuadra el pH agregando HCl y luego se completa a 50ml.

5.4.3 Almacenamiento.

Las muestras por frotis de mucosa oral son estables a temperatura ambiente por 1 hora. Se deben transportar en nevera portátil hasta la nevera fija y almacenarlas y mantenerlas a 8°C hasta que sean procesadas.

5.6 Instrumento de evaluación.

8. Desarrollo / Procedimiento

8.1 El Eppendorf con la muestra y el buffer de lisis (500ul) se extrae el hisopo haciendo presión contra las paredes, previamente rotulados y una base de datos, se procede hacer vortex a la muestra por 30 seg. Se retira el hisopo. Para obtener el ADN libre de los núcleos, las células serán digeridas adicionando Proteinasa K hasta una concentración final de 20 mg/ml. 10ul por 12 horas (o 5ul durante la noche)

8.2 Se coloca en incubadora a 56°C por un tiempo de 12 horas al baño María. Función: Digestión enzimática. Para detener la reacción de la PK se desnaturaliza a 95°C por 10 minutos.

8.3 Posteriormente se coloca en vortex por 5 seg, se adicionan 2/3 del vol. del buffer (300µL) mezcla de acetato de Amonio (AcNH₄) 8M/EDTA 1mM. Función: separación de Proteínas del ADN (Depuración)

8.4 Después de dejar por 10 minutos en frío, se centrifuga a 13000 RPM durante 10 minutos esto permite formar un pellet sólido que contiene restos de células, proteínas, Lípidos, de una fase acuosa, sobrenadante, que contiene ácidos nucleicos, hidrófilos y solubles en agua debido a sus grupos fosfato, Se colectará el sobrenadante (que contiene el ADN) en otro Eppendorf rotulado

8.5 Adición de un volumen igual al sobrenadante más el amonio, de isopropanol absoluto bien frío. (500ul+300ul=800ul de isopropanol) Función: Precipitación de ADN., ácidos nucleicos insolubles en alcohol se visualizan en interfase agua- alcohol y produciendo deshidratación

8.6 Mezclar varias veces suavemente por inversión, se guarda en nevera a -20oC por 1 hora Mínimo o hasta el día sgte) función:

8.7 Luego se centrifuga a 12000rpm durante 20 min a To ambiente, de esta manera se recuperan los ácidos nucleicos de la interfase y por centrifugación y posterior deshidratación se liberan del agua y del alcohol.

8.8 Se retira el sobrenadante cuidando que quede el pellet o concentrado de ADN

- 8.9 Lavar con 200 µL de etanol frío al 70%. Función: retirar el exceso de sales de amonio.
- 8.10 Se centrifuga 2-3 min y se elimina el etanol sobrante .
- 8.11 Secar totalmente el ADN precipitado a temperatura ambiente o 56°C 10 min
- 8.12. Adicionar de 100 µL de TE (Tris base 10 mM- EDTA 1mM) y se almacena a 4°C hasta su utilización. Se disuelve el ADN (averiguar)
- 8.13 Se almacena en refrigerador a -20°C

7. Restricciones y limitaciones del procedimiento.

Las limitaciones son mínimas. Pero es importante que el participante presente una cavidad limpia, no haya comido recientemente, especialmente alimentos cremosos, achocolatados o adherentes a mucosa

8. Seguridad.

Se debe utilizar guantes, gafas, tapabocas y bata de laboratorio como protección. Los materiales que se utilicen deben ser estériles. Todo el procedimiento debe ser realizado con todas las medidas de bioseguridad.

9. Formatos de Registro.

9.1 Encuestas de evaluación

10. Documentos interrelacionados

10.1 POE-TM-1.

11. Bibliografía

Brenda Richards, Joel Skoletsky, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. Human Molecular Genetics. Vol. 2. No.2 159-163 .1993

Aidar, M. and S.R. Line, A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J, 2007. 18(2): p. 148-52

Protocolos y métodos Preparación de Buffer Tris 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1)

Laboratorio de Genómica Viral y Humana Creado: 14 de Febrero del 2008 Facultad de Medicina UASLP www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Gral_Buffer_TE.pdf

Anexo 3. POE 003 Desparafinacion

 Universidad del Valle	DESPARAFINACIÓN MUESTRAS BIOPSIADAS.		POE-TM-003
Unidad: LABORATORIO. UNIVERSIDAD DEL VALLE	Proceso: 02		
REVISADO POR: (Cargo) MERCEDES FIGUEROA Bacterióloga Candidata Doctorado Ciencias Biomédicas			Fecha de creación 19 02 15 aa mm dd
APROBADO POR: (Cargo)			Fecha de Aprobación 00 00 00 aa mm dd Fecha de Actualización 16 04 02 aa mm dd

- Objetivo.**
 Obtener material de tejido con contenido de ADN a partir de muestras parafinadas aplicando protocolo para desparafinación
- Alcance.**
 Este procedimiento permite ser aplicado para técnicas moleculares por personal de laboratorio capacitado .
- Autoridad y Responsabilidad.**
 La autoridad para este documento es del director del proyecto de investigación de la propuesta de la estudiante Dolly Aristizàbal G, Mg (E) . Y la responsabilidad de aplicar este protocolo es de la investigadora del proyecto. Una vez obtenido los cortes de las muestras en eppendorf previamente rotulados se aplicarán los protocolos empleados por Chan et. al/ 01) adaptado por la Dra. Lida Inés Mancilla. 2012
- Definiciones.**
 Se realiza el cuidado de almacenamiento de cortes de muestras en tubos eppendorf, los cuales se guardaran a temperatura ambiente en recipiente plástico adecuado para tal fin
- Requerimiento de Recursos**

5.1 Tubos de Eppendorf rotulados con un código de identificación.

5.1.1 base de datos de control de cada código de identificación.

5.2 Materiales

5.2.1 Gradillas para tubos eppendorf de 1.5 ml

5.2.2 Tubos eppendorf de 1.5 ml.

5.2.3 Micropipetas de 200µl, 500 y 1000µl.

5.2.5 Puntas esterilizadas y papel parafilm.

5.2.6 Vaso de precipitados de 50 y 500 ml.

5.3 Equipos

5.3.1 Baño María marca (¿???)

5.3.2 Balanza clínica

5.3.3 Centrifuga

5.3.4 Microcentrifuga

5.3.5 Nevera fija

5.3.6 Vortex

8.2 Reactivos y soluciones.

- Xilol 800 µl por muestra
- Etanol absoluto 400 µl y 1ml por muestra
- Etanol al 70% 200 µl
- Mezcla de solución de digestión, 300 µl (Tris, EDTA, Tween20)
- Proteinasa K 5 µl (12 horas) 10 µl (si es + T')
- NaCl 3M (2/3volum)
- Isopropanol 1 vol. O Etanol absoluto 2 vol.
- Buffer TE 100 µl

5.4.2 Preparación.

5.4.2.1 Buffer de digestión 10 ml de se deben preparar:

Reactivo	[Final]	[Inicial]	Vol. inicial	Vol .final 10ml
Tris HCL pH 7.4	01M	1M	1 ml	10 ml
EDTA 3M	10mM	0.5 M	200 μ l	10 ml
TWEEN 20	0.4%	4 μ l/ml	40 μ l	10 ml
H ₂ O dest. esteril			8.760 μ l (8.76ml)	

Mezclar con H₂O el EDTA para que no se precipite con el Tween, luego el Tris y luego mas agua. Se requieren 300 μ l por cada muestra.

Las soluciones deben estar esteriles antes de prepararse

SOLUCION DE STOCK DEL Tris HCL

Para hacer preparaciones de stock se emplea un volumen 10 veces mayor que lo que requiere el protocolo a seguir. Se prepara primero el Tris, se coloca en un pH metro y se le va agregando HCl hasta alcanzar pH 8. Se realizan las preparaciones en un volumen 1 litro.

Solucion de stock de tris HCL	TRIS solucion de trabajo
En un volumen de 50 ml que se requiere para la solución de Tris HCl a pH=7.5; 1M V1= 50ml PM =121.14gm/mol C2= 1 M C1=? $PM * M * V$ $121.14 \text{ gm/mol} * 1 \text{ M} * 0.05 \text{ Lts} = 1.21 \text{ gms}$ Entonces: Se le agrega 6 gms a 30 ml de agua destilada de Tris se cuadra el pH agregando HCl y luego se completa a 50ml.	C1 = 1M C2 = 0.1M V2 = 10ml $V1 = \frac{0.1M \times 10ml}{1M}$ = 1ml

SOLUCION DE STOCK DE EDTA. Determinar cuánto debo pesar para preparar 50 ml de EDTA al 0.5M. a pH8 con NaOH. PM EDTA =372.26 gm/mol. Vol. = 50 ml = 0.05 L C= 0.5 M $PM \quad * \quad M \quad * \quad V$ $372.26 \text{ gm/mol} * 0.5 \text{ M} * 0.05 \text{ L} = 9.30 \text{ gm}$ Se mezclan 9.30 gms a un vol. de 30ml de agua destilada se le va agregando perlas de NaOH, se coloca en el pHmetro, hasta alcanzar pH8 y luego se completa hasta lograr 50 ml	SOLUCION DE TRABAJO EDTA C1 = 0.5M 500mM C2= 10mM V2= 10ml $V1 = \frac{10mM \times 10ml}{500mM} = 1/5 =$ 0.2ml= 200 µl
TWEEN 0.4% Significa que se tiene 0.4 µl por 100 ml = 0.004 ml/100ml= 4 µl/ml Como son 10 ml serian entonces : 4 x 10= 40 µl/10ml	

5.4.3 Preparacion TE

LA PREPARACIÓN DE BUFFER TRIS 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1)

Es una solución amortiguadora del Ph, proteger al DNA o RNA compone de TRIS 10Mm Da La capacidad amortiguadora del buffer ,El pH del buffer es ajustado con HCl: dependiendo del tipo de ácido nucleico, óptimo para RNA de 7.5. para el DNA de 8.0.

EDTA 1Mm Responsable de proteger a los ácidos nucleicos inactivando a las DNAsas o RNAsas actuando como quelante de cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} los cuales son indispensables para el funcionamiento de las enzimas

Tabla de preparación:

	CF 1X	5ml	10ml	50ml	100ml	250ml	500ml	1000ml
1M TrisHCl	10 mM	50 μl	100 μl	500 μl	1 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml
0.5M EDTA	1 mM	10 μl	20 μl	100 μl	0.2 ml	0.5 ml	1 ml	2 ml
dH ₂ O		4.94 ml	9.88 ml	49.4 ml	98.8 ml	247 ml	494 ml	988 ml

SOLUCION DE STOCK DE EDTA.

Determinar cuánto debo pesar para preparar 50 ml de EDTA al 0.5M. a pH8 con NaOH.

PM EDTA =372.26 gm/mol.

Vol. = 50 ml = 0.05 L

C= 0.5 M

$$\text{PM} \quad * \quad \text{M} \quad * \quad \text{V}$$

$$372.26 \text{ gm/mol} * 0.5 \text{ M} * 0.05 \text{ L} = 9.30 \text{ gm}$$

Se mezclan 9.30 gms a un vol. de 30ml de agua destilada se le va agregando perlas de NaOH, se coloca en el pHmetro, hasta alcanzar pH8 y luego se completa hasta lograr 50 ml

SOLUCION DE TRABAJO DE Tris Hcl

En un volumen de 50 ml prepara la solución de Tris HCl a pH=8.0; **1M**

V1= 50ml

PM =121.14gm/mol

C2= 1 M

C1=?

$$\text{PM} \quad * \quad \text{M} \quad * \quad \text{V}$$

$$121.14 \text{ gm/mol} * 1 \text{ M} * 0.05 \text{ Lts} = 6 \text{ gms}$$

Entonces: Se le agrega 6 gms a 30 ml de agua destilada de Tris se cuadra el pH agregando HCl y luego se completa a 50ml.

5.4.3 Almacenamiento.

Los cortes de muestras parafinadas son estables a T_o ambiente. Una vez procesadas deben guardarse en nevera a -20°C

5.5 Controles de calidad de la prueba.

Una vez realizada la extracción del ADN debe proceder a valorar la cantidad y pureza mediante espectrofotómetro The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 . con una alta precisión y reproducibilidad mide 1 µl de muestra . concentración recomendada de ADN 50 a 100 ng y una absorbancia (260/280) entre 1.7 y 2.0

5.6 Instrumento de evaluación.

9. Desarrollo / Procedimiento

6.1 Se coloca la muestra en un eppendorf tres cortes de 5 µl

6.2 Se le adiciona 800µl de Xilol, se mezcla realizando movimientos de inversión suave durante 5 minutos con agitación constante por inversión suave del tubo a temperatura ambiente.

6.3 Se centrifuga a 14000 rpm por 5 min y se repite nuevamente lavado con Xilol. y una vez este paso, se retira el Xilol.

6.4 Se agregan 400 µl de etanol absoluto a T ambiente, se realiza mezcla por inversión por 1 min (se requiere mezclador horizontal)

6.5 Se centrifuga 2 min 13.000 RPM Se decanta el sobrenadante observando pellet de la muestra.

6.6 Se le agrega 1mL de etanol absoluto a T ambiente, se centrifuga 2 min 14.000 rpm Se elimina el etanol, por decantación. Si quedan algún resto de sobrenadante se puede eliminar con punta y micropipeta de 10µl se deja secar completamente a T_o ambiente o se coloca en incubadora 50°C por 20 min. hasta que seque **completamente**.

6.7 Se observa el pellet, se le agrega 300 µL de solución de digestión Se le adiciona 10 µL de proteinasa K a una concentración de 0,5 mg/ml (si se deja al baño Ma. por 12 horas) 5 µL (si es por más de 12 horas) Baño Ma. Toda la noche a 55°. A los eppendorf se le coloca un parafilm para protección.

6.8 Se observa en el término, si se presentó digestión de la proteinasa, observando que todo el material quede disuelto en el buffer. No se deben observar grumos o acúmulos gruesos de tejido, Tratar de que quede casi que transparente al observar. Con la formación de un precipitado de material celular. (De no ser así dejar una hora más agregando otros 5ul de proteinasa K por 1 hora)

6.9 Se continua con una pequeña perforación de la tapa del eppendorf se deja en baño Ma. Por 10 min a 95°C (para desnaturalizar la proteinasa K)

6.10 Se centrifuga 10 min a 13000 RPM Se coloca el sobrenadante en un eppendorf esterilizado y rotulado adecuado, se adiciona 2/3 del volumen de 3M de NaCl, en nevera -20 °C x 30`min a 2 hr.

6.11 Se centrifuga 20 min a 13 RPM. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente en otro eppendorf previamente rotulado se adiciona 1 vol. De isopropanol (o 2 vol. de etanol absoluto) se realiza inversión lenta de la mezcla y se deja en refrigerador -20o toda la noche.

6.12 Al día siguiente se realiza centrifugación 30 min a 14 RPM. Se decanta la mezcla y se deja escurrir por 5 minutos Se adiciona 200 µL de etanol 70% se hace inversión para limpiar paredes y se centrifuga 2 o 3 min, y se elimina el etanol sobrante.

6.13 Dejar secar a temperatura ambiente o a 50oC por 10 minutos. Cuando el tubo esté completamente seco se agrega 100 µl de TE, se coloca en vortex uno segundos.

6.14 Para aumentar la solubilidad del ADN, se incuba a 37oC por 10 minutos. Se colocan en gradilla y se guardan en la nevera a -4oC por dos o tres semanas o a -20° C por mayor tiempo.

7. Restricciones y limitaciones del procedimiento. El manejo del protocolo paso a paso evita el mínimo error de procedimiento

8. Seguridad. Se debe utilizar guantes, gafas, tapabocas y bata de laboratorio como protección. Los materiales que se utilicen deben ser estériles . Todo el procedimiento debe ser realizado con todas las medidas de bioseguridad.

9. Formatos de Registro.

9.1 Bitacora de control

10. Documentos interrelacionados

10.1 POE-TM-001 y 002.

11. Bibliografía

-Chan PKS, Chan DPC, To K-F, Cheung JKL, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral ADN. J Clin Pathol 2001; 54:401-403.

-- Jiménez Arce Gerardo, Villalobos Quesada María José , Jiménez Montero Ernesto, Palma Platero Walter -. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 2007 Sep. Vol.1, No. 1,

Anexo 4. POE Electroforesis Agarosa (1)

 Departamento de Morfología	ELECTROFORESIS DE EN GEL DE AGAROSA	
Unidad: Lab. de Biología Molecular	<i>Proceso: Electroforesis en gel de agarosa</i> <i>Código POE: 4</i>	
REVISADO POR:		Fecha de creación 22 11 13 dd mm aa
APROBADO POR: Mercedes Figueroa Macca Profesora de biología de Molecular - Departamento de Morfología		Fecha de aprobación 22 01 14 dd mm aa
REALIZADO Y ESTANDARIZADO POR: Dolly Aristizábal García		Fecha de realización 22 11 13 dd mm aa

Introducción

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). En este protocolo se da un bosquejo general de la electroforesis, considerando que **la electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico**; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una mezcla de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una

separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm.

Su signo es igual al de la carga de la partícula. **La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula** (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.¹

De lo anterior se deduce que **el pH influye sobre la velocidad de migración** de las moléculas.² En el punto isoelectrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

pI = 0 No hay migración

+ < 0 > -

Carga (+) y migra hacia el cátodo

No migra

Carga (-) y migra **ánodo**

- **Objetivo.**

Realizar la electroforesis en gel de agarosa de ADN o amplificadores de ADN extraído a partir de tejido parafinado, de biopsias orales

- **Alcance.**

Este procedimiento está dirigido a todo el personal de la unidad de Biología Molecular del Departamento de Morfología que requiera verificar ADN genómico o amplificado a partir de tejido humano.

- **Autoridad y Responsabilidad.**

La autoridad para este documento es del coordinador de la unidad, y la responsabilidad del proceso es de la persona que realice el procedimiento.

- **Materiales y reactivos:**

3.1 Materiales

1. Tubos Eppendorf de 0.2 ml
2. Puntas de 10 ml.
3. Puntas de 0.4 mm de ancho para carga de gel.
4. Beaker de 100ml.
5. Gradillas
6. Peines para electroforesis de 25 pozos (0,4 mm de ancho).

3.2 Equipos:

1. Cámara de electroforesis
2. Fuente de poder
3. Microondas
4. Micro pipetas para medir volúmenes de: 1 – 10 ul, 100 – 1000ul
5. Pipeta de 10 ml.
6. Trasiluminador
7. Cámara fotográfica

3.4 Reactivos:

1. Bromuro de etidio
2. TBE 10x.
3. Agarosa
4. Agua Biodestilada
5. Marcador de peso (MP)

Material genético: 10 ul ADN extraído.

4. Procedimiento.

Al iniciar todo proceso se recomienda previamente realizar la limpieza de cabinas con el protocolo de limpieza sugerido por el laboratorio. Además deben prepararse los reactivos necesarios previamente antes de iniciar la extracción para evitar impases:

Guía de electroforesis

1. Construcción del tampón de corrida TBE: Tris, ácido bórico y EDTA:

Para el tampón o buffer de corrida TBE pese lo siguientes reactivos:

1. 10.8 grs de **Tris** (viene a 1X, normalmente se usa a 0.5)
 - i. $10.8/2 = 5.4$ grs
2. 5.5 grs de **ácido bórico**
 - i. $5.5/2 = 2.75$ grs
3. 4 ml **EDTA** 0.5
 - i. $4/2 = 2$ ml

Preparar la solución:

Proteja la bandeja de la balanza. Pese el Tris y el ácido bórico de acuerdo a los pesos determinados

- Diluir en 1 litro de agua ultrapura así:
- Disolver el Tris y el ácido bórico en 500ml, agitar

- Adicionar 2ml de EDTA, agitar
- Adicionar los 500ml restantes de agua ultrapura, agitar.

Guardar a temperatura ambiente debidamente marcado

Construcción de la matriz semisólida " GEL DE AGAROSA al 1%"

Pese 1 gr de agarosa por cada 100 ml (la cubeta se llena con 50ml, entonces se hace 0.5gr en 50 ml)

- 0.5gr de agarosa
- 50ml del buffer de corrida TBE
- Mezclar y agitar.
- .Colocar en el microondas x 1minuto (cubrir con papel parafinado).
- Atemperar a 45°C la solución. No dejar solidificar.
- Adicionar bromuro de etidio a una concentración de 0.5 microgramos por ml. (normalmente se encuentra a 10 mg/ml). Generalmente se adicionan 2.5 ul de bromuro de etidio, agitar.
- Colocar en el molde de la cámara de electroforesis.
- Colocar el peine
- Esperar la solidificación del gel

Sumergir el gel de agarosa en el buffer de corrida sobre la plantilla de la cámara de electroforesis.

Preparación del ADN con el tampón de carga:

1. Diluir el tampón de carga a 1X (normalmente viene a 5X). y mezclar con l agua:

- 3 ul de agua destilada
- 2ul de buffer de carga (verde)
- 5 ul de DNA (muestra)

10 ul TOTAL

2. Previa adición del ADN debe mezclarse previamente en un tubo Eppendorff el buffer de carga con el agua. De esta mezcla tomar 5 ul y colocarla sobre papel parafinado x cada muestra. Mezclar bien por separado cada muestra.

3. Al gel de agarosa sumergido en el buffer de corrida adicionar el marcador de peso molecular Lambda (Hay 2 marcadores: Lambda – 1Kb). Preparación de 10 ul de marcador de peso molecular, previamente preparado:

7ul de agua ultrapura
2 ul de buffer carga (verde)
10 ul de marcador de peso molecular
10ul TOTAL

4. **Servida de ADN en pozos:** En los pozos del gel de agarosa, servir cada muestra preparada previamente en la microplaca (10microlitros de cada una).

5. Servir el marcador de peso molecular lambda DNA en el lugar definido (extremo izquierdo del frente de corrida)

6. **Corrida de electroforesis:** Iniciar corrida de la electroforesis a 75 Voltios y 50 mA Constante de voltaje. Deje correr la electroforesis por 30 a 45 minutos

7. **Verificación:** En el tras iluminador (Luz UV) las bandas, usando cono y gafas anti UV.

8. **Fotografía:** Tomar fotografía inmediatamente Baje la foto en su PC o computador y edítela.

Nota: Tener en cuenta todas las reglas de bioseguridad. Recordar la toxicidad del BROMURO DE ETIDIO. Descartar todo material desechable dentro de la zona de electroforesis. Descartar las geles en agua, para ser procesadas con carbón activado según protocolo de desecho.

Anexos

Características de los reactivos:

Gel de agarosa

- Medio de separación de los ácidos nucleicos produciendo bandas de DNA y RNA con baja fluorescencia
- Presentación: Frasco 100gr
Frasco 250gr
Frasco 500 gr
Frasco de 1000 gr
Proveedor: SIGMA-ALDRICH
- Fecha de vencimiento: No tiene

Bromuro de Etidio

- Tinción del gel de agarosa para visualizar la presencia de ácidos nucleicos.
- 0.5 ug/ml
- Presentación: Polvo 1gr - 5gr - 25 gr
- Proveedor: SIGMA
- Fecha de vencimiento: No tiene

Tiempo de duración después de preparado: indeterminado – Conservarse refrigerado -20C°

GELRED

- Reemplaza el bromuro de etidio. Menos efectos tóxicos.
- Presentación: Polvo 0.5 ml - Proveedor: Gene express Chile
Fecha de vencimiento: No tiene

Green Go Taq Buffer

- Bloquea la actividad de la polimerasa
Amplificación – Incremento de la densidad de la muestra
 - Presentación: Liquido 100u / 1 ml
- Proveedor: PROMEGA
- Fecha de vencimiento: No tiene
- Almacenar a -20C°

DNA ladder 100 bp

- Corresponde a nucleótidos. El reactivo contiene 100 pb
- Presentación: Liquido 100ug - 1 ug/ul .Proveedor: PROMEGA
- Fecha de vencimiento: No tiene
- Almacenar a -20C°

Buffer TBE

- Ficha técnica: Ver
- Para que sirve: Crea el medio para la separación de los ácidos nucleicos. TBE se usa con los geles de no desnaturización o de desnaturización (7 M urea). También se utilizan habitualmente con gel de secuenciación ADN automatizada.
- Presentación: 5x 4 litros
Proveedor: SIGMA

Fichas técnicas: Ver anexos

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chávez Planes MA, Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana, 1990
2. Nochumson S, inventors; FMC Corporation, assignee. Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium. US patent 4,542,200. 1985 Sep 17.
3. Campell MK. Biochemistry. Second edition. Saunders College Publishing. 1995.
4. Garfin DE. One dimensional gel electrophoresis. Methods in enzymology. vol 182. Academic press. 1990.
5. Moi MK, Chan RT, Becker RG, Chalmers KC, inventors; C C IMEX assignee. Horizontal gel electrophoresis casting cassette. US patent 5 938 906. 1999 Aug 17.
6. Hooper HH inventor; Soane Biosciences assignee, Us-crosslinked polymeric media for electrophoresis. US patent 5 885 432. 1999 march 23.
7. Bambeck S.G. Electrophoresis separation gel and method for preparing an electrophoresis separation gel. USA patent number. 5 589 104. (1996)
8. García HM. Adaptación de geles de poliácridamida a sistema PhastSystem. Tesis de Maestría. Facultad de Biología UH. Diciembre del 2000
9. Alpenfels WF, Engelhorn S, Manis D inventor; Novel Experimental Technology, assignee. Plastic mold for electrophoresis gel. US patent 5,753,095. 1998 May 19.
10. Gaal O, Medgyesi GA, Vereczkey L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Akademiai Kiado Budapest and John Wiley & Sons. 1984
11. Sheer DG, Yamane DK, Hawke DH, Pau-Miau Yuan. The use of micro preparative electrophoresis of protein/peptide isolations for primary structure determinations. Peptide Research. 1990; 3 (2).
12. Schägger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Analytical Biochemistry 1987; 166, 368-379.
13. Inzana TJ, Apicella MA. Use of a bilayer stacking gel to improve resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1999; 20 (3): 462-5.
14. Opplitt JJ, inventor. Discontinuous and nonsequential polymeric gel systems for separation of macromolecules. US patent 5 968 332. 1999 Oct 19.
15. Jovin TM. Multiphasic Zone Electrophoresis. I, II, III y IV. Biochemistry 1973; 12 (5): 871-496.
16. Starr CM, inventors; Glyko, Inc., assignee. Utilization of additives and defined storage systems to increase the stability and performance of electrophoresis media. US patent 5,660,702. 1997 Aug 26.
17. Rice S, Browning C, Burke J, Nguyen L, inventors; Genetic Biosystems Inc, assignee. Membrane loader for gel electrophoresis. US patent 5 972 188. 1999 Oct 26.
18. Bjellqvist B. inventor; Pharmacia Biotech AB, assignee. Buffer system for electrophoresis and use thereof. US patent. 6 090 252. 2000 July 18.
19. Schuhmacher M, Glocker MO, Wunderlin M and Przybylski M. Direct isolation of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analysis by electro spray-ionization mass spectrometry. Electrophoresis 1996; 17 (5) : 848-54.
20. Jeannot MA, Zheng J and Li L. Observation of sodium gel-induced protein modifications in dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its implications for accurate molecular weight determination of ge-separated proteins by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. J. Am. Mass. Spectrom. 1999; 10 (6):512-520.
21. Zhang J, Zhang L, Zhao S, Lee EY. Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. Biochemistry. 1998; 37(47):16728-34.
22. Seichi S, Chait BT. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. Anal Chem, 1998; 70 (824): 5150-8.
23. Guo Y, Li X, Fang Y. The effects of electroendosmosis in agarose electrophoresis. Electrophoresis. 1998; 19 (8-9): 1311-3.
24. Da Woon J, Gyoung Hoon T, Jin Wook L, Chan Jin B, Gil Young K, Gyurmg Soo Y, y Jung Kap C. Detection of proteins in poliácridamida gels using eriochrome black T rhodamina B. Anal. Biochem. 1998; 263:118-120.
25. Notsu K. And Shiratori M, inventors; Daiichi Pure Chemicals Co., assignee. Method for drying polyacrylamide gel after electrophoresis, US patent 5 635 046. 1997 june 3.
26. **García Pérez H.** Laboratorios BETERÁ. Calle 102 e/ 31 y 31-B. Marianao. Ciudad de La Habana. E-mail: betera@infomed.sld.cu

Anexo 5. Comité UV

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana

Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 07-014

Proyecto: **DETECCION DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA SANA, LESIONES VERRUGOSOPILARES, LEUCOPLASIA Y CANCER ESCAMOCELULAR ORAL: ESTUDIO EN BLOQUES PARAFINADOS POR TECNICA DE PCR**

Sometido por: **ADALBERTO SANCHEZ/LIDA INES MANCILLA/DOLLY ARISTIZABAL G/ARMANDO D. CORTES/OSCAR TAMAYO/MERCEDES FIGUEROA/FABIO ROJAS**

Código Interno: **058-014**

Fecha en que fue sometido:

21

03

2014

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (**CIREH**), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica que:**

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

- | | |
|---|---|
| ☒ Resumen del proyecto | ☒ Protocolo de investigación |
| ☒ Formato de consentimiento informado | ☒ Instrumento de recolección de datos |
| ☐ Folleto del investigador (si aplica) | ☒ Cartas de las instituciones participantes |
| ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

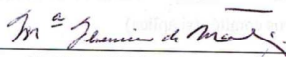
3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo:**

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos humanos.

Calle 4B 36 -00 edificio Decanato Teléfono: 5185677 email: eticasalud@univalle.edu.co

- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma: 
Nombre: **FLORENCIA VELASCO DE M.**

Fecha: 08 07 2014

Capacidad representativa: **PRESIDENTA**

Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma: 
Nombre: **MAURICIO PALACIOS**

Fecha: 08 07 2014

Capacidad representativa: **VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD**

Teléfono: 5185680

Anexo 6. Comité HUV


HOSPITAL UNIVERSITARIO
DEL VALLE

FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROPUESTAS DE INVESTIGACIÓN

Datos generales del Proyecto:

DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA SANA, LESIONES
VERRUGOSAS PAPILARES, LEUCOPLASIA Y CÁNCER ESCAMOCELULAR ORAL: ESTUDIO DE BLOQUES
PARAFINADOS POR TÉCNICA DE PCR.
Dolly Aristizabal, Lidia Inés Manóvil, Oscar Tamayo, Armando Cones

Código: 001-2014

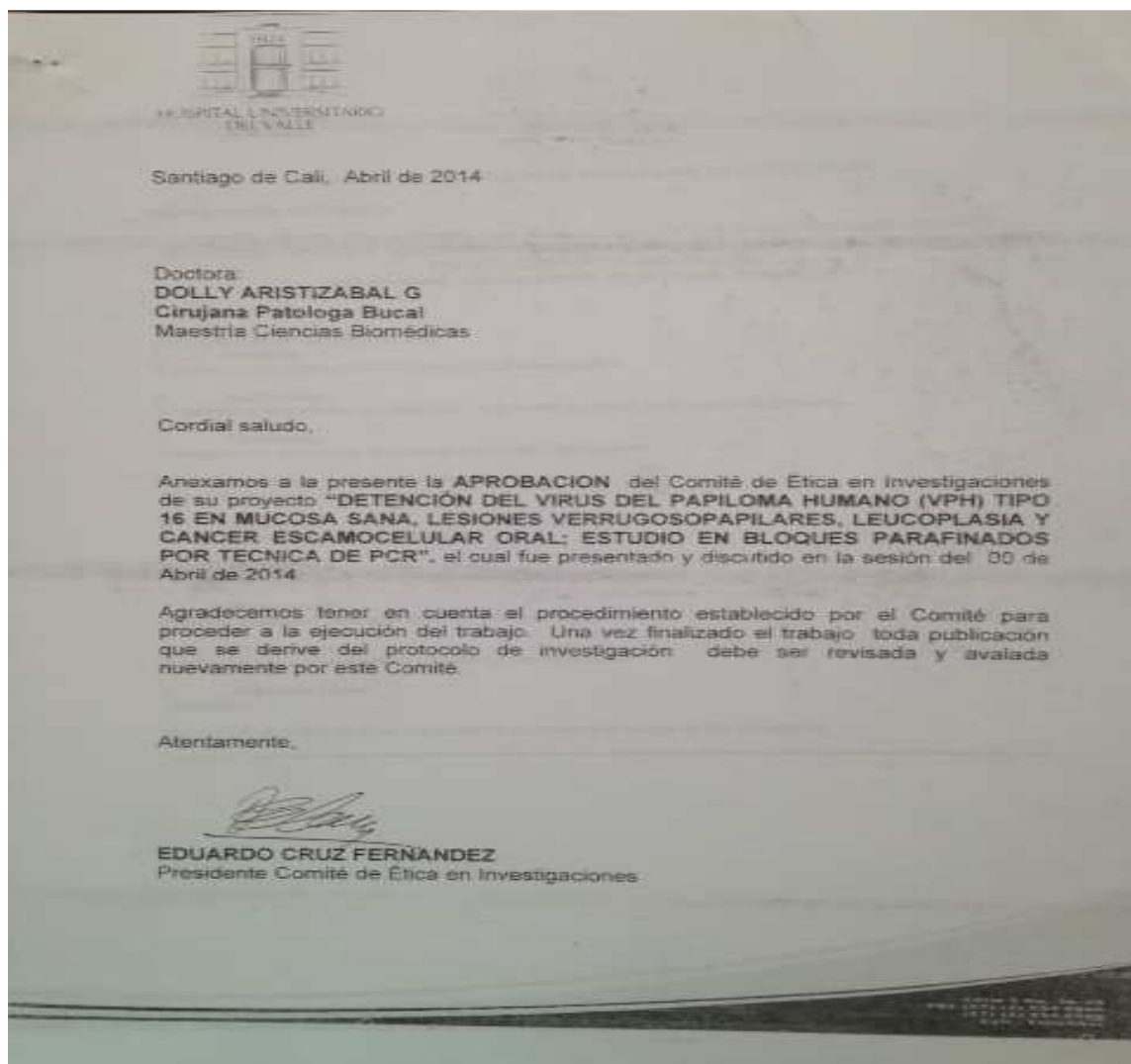
EVALUACIÓN DE LA PROPUESTA

1. **Precisión:**
El proyecto contempla problema y pregunta de investigación.
2. **Justificación:**
Se destaca la importancia de realización, argumenta magnitud y naturaleza del problema.
3. **Pertinencia:**
Pertinente con enfoque en diagnóstico y el cuidado del paciente.
4. **Marco Teórico y Estado del Arte:**
Desarrollo en forma lógica, actualizado.
5. **Objetivos:**
Precisos y coherentes con el problema.
6. **Metodología:**
Permite dar claridad en el manejo estadístico de la información.
7. **Presupuesto:**
Relación detallada y razonable entre los diferentes rubros.
8. **Cronograma:**
Secuencia lógica de actividades para el logro de los objetivos.
9. **Aspectos Éticos:**
Adecuados.

Pienso que se podría aprobar, haciendo la sugerencia de buscar un Bio-estadístico.

Calle 5 No. 3a-52
P.O. Box 1520-02, 254 000
1571-23 254 0700
Cali - Colombia

Anexo 7. HUV comité ética aprobado



Anexo 8. Comité USC



ACADEMIA CON
RESPONSABILIDAD SOCIAL

UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
COMITÉ CIENTÍFICO DE ÉTICA Y BIOÉTICA – “CEB-USC”
FACULTAD DE SALUD

Santiago de Cali, Abril 4 de 2014

Doctor(a):

Lida Inés Mancilla

Adalberto Sánchez

Oscar Tamayo

Estudiantes

Dolly Aristizabal, Mercedes Figueroa

Profesor y estudiantes del Programa de Odontología

E. S. M.

Asunto: Solicitud de Aval para el Anteproyecto de Investigación titulado: **Detección del virus del Papiloma Humano (VPH) tipo 16 en mucosa sana, lesiones verrugosopapilares, leucoplasia y cáncer escamocelular oral**; estudio en bloques parafinados por técnica PCR.

El comité Científico de Ética y Bioética de la Universidad Santiago de Cali – “CEB-USC” - Facultad de Salud - en la sesión del día 21 de marzo de 2014, según Acta N° 02, en uso de sus funciones para las cuales fue creado, resuelve:

OTORGAR EL AVAL DESDE EL PUNTO DE VISTA ÉTICO Y BIOÉTICO, al anteproyecto referido en el asunto anterior, con la (s) siguiente (s) recomendación (es):

- Que si durante el desarrollo del proyecto de Investigación, el equipo investigador encuentra alguna(s) situación(es) anormal(es) que pueda(n) perjudicar, o alterar el objeto involucrado en el estudio, se debe informar de inmediato a este comité, ya que cualquier hallazgo en este sentido, puede variar el curso de la investigación.
- Se solicita tener en cuenta las observaciones y sugerencias anotadas en la forma de análisis del anteproyecto anexa.

Atentamente,

GLORIA LIZALDE
Presidenta del Comité de Ética

CATALINA ESTRADA G.
Secretaria del Comité de Ética

CC: Archivo del CEB-USC-Facultad de Salud



Calle 5a Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX: 518300 Telefax: 0925523531
Web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia

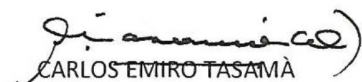
Anexo 9. Autorización tasama

Cali, 5 de noviembre de 2013

Señores
COMITÉ DE ETICA
Universidad del Valle

Certifico que los reportes histopatológicos emitidos en mi nombre, sobre diagnóstico de lesiones con características y compatibles con infección por VPH de cavidad oral son resultado del análisis sistemático y confiable para ser utilizados con propósitos académicos. Una porción de este material en bloques parafinados, ha sido aportada para ser empleada en análisis moleculares que confirmen la presencia este virus y como apoyo en la investigación que esta realizando la Dra. Dolly Aristizàbal G

Expreso que el material entregado son muestras de lesiones remitidas por diversos profesionales clínicos de la salud.


CARLOS EMIRO TASAMÀ
Patólogo Oral

Anexo 10. Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA SANA Y EN LESIONES VERRUGOSO PAPILARES, LEUCOPLASIA Y CANCER ESCAMOCELULAR ORAL; ESTUDIO EN BLOQUES PARAFINADOS POR TECNICA DE PCR

Le estoy invitando a participar en una investigación que tiene como objetivo Determinar la presencia del virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 en mucosa sana y en otro tipo de muestras que se encuentran en bloques parafinados, mediante una prueba llamada Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) que permite reconocer la presencia del virus a nivel intracelular (dentro de la célula).

Si usted decide participar de manera voluntaria, lo hará en el grupo de muestras de mucosa sana; serán 100 personas a las cuales se les tomarán dos (2) muestras mediante un frotis (se recoge un poco de tejido, con un copito de algodón) de la parte interna de la boca, proceso que no genera dolor o incomodidad, ni ningún tipo de riesgo; las muestras serán colocadas en unos frascos llamados Eppendorf, rotulados mediante un código lo que permitirá que su nombre y datos estén protegidos; adicionalmente se le solicitará responder algunas preguntas por escrito, relacionadas con el estudio, con un tiempo de participación aproximado de 15 minutos. Su responsabilidad al participar consiste en colaborar con la toma de la muestra y contestar las preguntas de manera veraz.

Los beneficios que obtendrá con este estudio es conocer el estado de salud oral con respecto a la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH), en las muestras estudiadas, de igual manera dará un aporte al conocimiento de la patología viral (enfermedad) a nivel de la cavidad bucal y también en la profesión odontológica y comunidad en general.

Con su participación no incurrirá en ningún gasto ni recibirá ningún tipo de remuneración económica por ello, usted puede decidir no participar en cualquier momento sin que esto altere de alguna forma el tratamiento que está siguiendo.

Una vez concluida la investigación los resultados le serán informados y en caso de necesitar un tratamiento, le será indicado el profesional que puede ayudarlo oportunamente.

Usted recibirá una copia de este documento.

AUTORIZACIÓN DEL PACIENTE

Después de entender la información que se me ha dado acerca de la investigación, autorizo que mis muestras y datos sean utilizados en este estudio y otros posteriores, si así se requiere. SI ____ NO ____

En caso de necesitar información puede comunicarse con la Dra. DOLLY ARISTIZABAL G, 3188170342 y 3103737869, Comité Institucional de Revisión de Ética Humana Univalle Tel. 5185677, Comité de Ética USC 5183000.

Nombre: _____ CC. _____

Dirección y teléfono: _____

Lugar y fecha: _____

Testigo 1

Testigo 2

CC. _____

CC. _____

Anexo 11. Encuesta para muestras de mucosa oral



DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA SANA Y EN LESIONES VERRUGOSOPAPILARES, LEUCOPLASIA Y CANCER ESCAMOCELULAR ORAL; ESTUDIO EN BLOQUES PARAFINADOS POR TECNICA DE PCR

Trabajo de investigación para optar el título de Maestría en Ciencias Básicas
Investigadora: Dolly Aristizábal G.
Cirujana y patóloga Bucal

1. Ciudad		2. Fecha		3. No. Participante	
4. Nombre y Apellido			5. Documento de Identidad		
6. Dirección de residencia		7. Teléfono fijo		8. Celular	
9. Edad		10. Fecha de nacimiento		DD	MM AA
11. Con cuantas personas convive en su hogar:					
12. Promedio de ingresos:		Hasta un salario mínimo		De 2 a 3 salarios Más de 3 salarios	
13. Nivel de Escolaridad:		Sin estudios		Primaria	Secundaria Técnica Universitaria
14. Etnia:	Indígena	Negra	Blanca	Mestiza	Otra:
15. Estado civil:	Soltero(a)	Unión libre	Casado(a)	Separado(a)	
16. Número de embarazos:	Partos:	Hijos vivos	Abortos		
17. Ha tenido relaciones sexuales?		Si	No	Edad de la primera relación sexual:	
		Vida sexual activa:		Si	No
18. Numero de compañeros sexuales:		Ninguno:	1	2	3 Más de 3
19. Le han diagnosticado VPH?:		Si	No		
20. A su compañero(a) le han diagnosticado VPH?:		Si	NO		
21. Practica sexo oral?		Si	No		
22. Consume bebidas alcohólicas?		Nunca	Ocasional	Fin de semana	Relativa frecuencia
23. Ha fumado alguna vez?:		Si	No	Hace cuanto fuma:	Menos de 1 año De 1-3 años + de 3 años
				Cuanto tiempo hace que no fuma:	Menos de 1 año De 1-3 años + de 3 años

Dolly Aristizábal G.
Contactos: Celular 318 8170342 – 310 3737869

Anexo 12. Acta aprobación

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana

Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 07-014

Proyecto: **DETECCION DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) TIPO 16 EN MUCOSA SANA, LESIONES VERRUGOSOPAPILARES, LEUCOPLASIA Y CANCER ESCAMOCELULAR ORAL: ESTUDIO EN BLOQUES PARAFINADOS POR TECNICA DE PCR**

Sometido por: **ADALBERTO SANCHEZ/LIDA INES MANCILLA/DOLLY ARISTIZABAL G/ARMANDO D. CORTES/OSCAR TAMAYO/MERCEDES FIGUEROA/FABIO ROJAS**

Código Interno: **058-014** Fecha en que fue sometido: **21** **03** **2014**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | |
|---|---|
| ☒ Resumen del proyecto | ☒ Protocolo de investigación |
| ☒ Formato de consentimiento informado | ☒ Instrumento de recolección de datos |
| ☐ Folleto del investigador (si aplica) | ☒ Cartas de las instituciones participantes |
| ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada.

6. Este proyecto será revisado nuevamente en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.

7. Informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

8. Informará inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:

- Lesiones a sujetos humanos.

Calle 4B 36 -00 edificio Decanato Teléfono: 5185677 email: eticasalud@univalle.edu.co