

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Odontología
Posgrado de Cirugía Oral y Maxilofacial
Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud

Asociación de *Helicobacter pylori* con cáncer oral.

Dra. Diana Gabriela Pérez Infante

Director de tesis: Dr. Claudio Cabral Romero
Co-director de tesis: Dra. Myriam de la Garza Ramos
Asesora: Dra. Belinda Beltrán Salinas

Monterrey, Nuevo León. Febrero 2014



Dr. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda
Subdirector de Estudios de Posgrado

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

C.D.M.F. Dra. Belinda Ivett Beltrán Salinas
Presidente

C.D.M.F. Dr. Armando Cervantes Alanís
Secretario

C.D.E.O.P. Dra. Eyra Elvyra Rangel Padilla
Vocal



Dedicatoria

A mi **madre** porque no me alcanzarían 1000 vidas para pagar todo el amor, los sacrificios y el apoyo que siempre me ha dado. Gracias a Dios por ser tu hija.

Carlos y Rubén por cuidarme y quererme tanto.

A toda mi familia por los ánimos y el apoyo incondicional.

A mis **maestros** ojala algún día pueda ser como ustedes: una persona extraordinaria.

Miriam, Yulieth, y Fabian por ser quienes me ponen los pies en la tierra y me hacen ver las cosas con claridad.

Jesús gracias por salvarme y por hacerme una mejor persona, gracias por ser mi ángel de la guarda.



Agradecimientos

A **Dios** por estar conmigo siempre y hacerme una persona feliz.

Al **Dr. Claudio Cabral** por dirigir esta investigación, por su exigencia para poder hacer un trabajo de calidad.

A la **Dra. Myriam de la Garza** por permitirme utilizar los recursos de su departamento. Gracias por no perder la esperanza en mi proyecto.

A la **Dra. Belinda Beltrán** porque sin su constancia esta sede no existiría.

A mis maestros: **Dr. Armando Cervantes, Dr. César Villalpando, Dr. Adolfo Uribe** por sus enseñanzas, gracias por compartir sus conocimientos.

Al **Dr. José Manuel Faz Eguía** por su humildad, por enseñarme y permitirme realizar esta investigación en sus pacientes.

A la **Q.B. Vilma** por el apoyo incondicional a esta investigación, por los ánimos.

Al **Lic. Gustavo Martínez González** por realizar la parte estadística de esta investigación y sus observaciones para mejorar este trabajo.

A mis compañeros **residentes** gracias por los buenos momentos y por todo lo que aprendimos juntos.

A **Aracely, Coco y Bety** por su amistad y cariño.

A mis **PACIENTES** por confiarme su salud, gracias por todas sus bendiciones.



INDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 8 |
| INTRODUCCIÓN | |
| Epidemiología y etiología del Cáncer | 9 |
| Manifestaciones clínicas | 10 |
| Diagnóstico | 11 |
| Cáncer Oral | 11 |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 12 |
| Incidencia de <i>Helicobacter pylori</i> | 13 |
| <i>Helicobacter pylori</i> y cáncer oral | 14 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| JUSTIFICACIÓN | 20 |
| OBJETIVOS | 22 |
| HIPÓTESIS | 23 |
| MATERIAL Y MÉTODO | |
| Tipo de estudio | 24 |
| Periodo de estudio | 24 |
| Lugar de estudio | 24 |
| Población de estudio | 25 |
| Criterios de inclusión | 25 |
| Criterios de exclusión | 25 |
| Variables | 26 |
| Tamaño de muestra | 26 |
| Procedimiento | 27 |
| Toma de muestra | 28 |
| Extracción de ADN | 30 |
| Sonda y Oligonucleótidos | 30 |
| Programa del termociclador | 31 |
| Recursos | 33 |
| Análisis de resultados | 35 |
| Prueba de hipótesis | 36 |
| RESULTADOS | 38 |
| Grupo control | 39 |
| Grupo de pacientes con cáncer oral | 40 |
| Descripción de datos | 41 |
| Planteamiento de las hipótesis | 42 |
| Distribución de la prueba | 42 |
| Criterio de decisión | 42 |
| Estadística de prueba calculada | 43 |
| DISCUSIÓN | 44 |
| CONCLUSIONES | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA | 48 |
| ANEXOS | 51 |



RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria móvil, microaerófila, gram-negativa, en forma de espiral, asociada al desarrollo de gastritis, úlceras gástricas y cáncer gástrico. Se piensa que *H. pylori* puede alojarse en boca y de ahí pasar a estómago a través del bolo alimenticio. *H. pylori* tiene propiedades citotóxicas directas que son perjudiciales para los tejidos, se encontró que la bacteria causa la liberación de fosfolipasa A2, proteasas y lipasas. La inflamación crónica contribuye y finalmente produce o puede ser causal de cambios malignos en algunos casos.

Objetivo. Identificar si existe una relación directa entre la presencia de *Helicobacter pylori* en boca como factor predisponente para el cáncer oral.

Materiales y métodos. Se analizaron 40 pacientes, 20 pacientes sanos pertenecen al grupo control y 20 con diagnóstico de cáncer oral, de los cuales se tomó una muestra de saliva y otra de placa dental. Estas muestras se obtuvieron asépticamente, posteriormente se inocularon en medio de cultivo de agar sangre especial para el crecimiento de la bacteria. Después de 4 días de incubación, se volvió a sembrar y se incubaron durante otros 4 días. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico de cada muestra para confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* por PCR en tiempo real. **Resultados.** Se analizaron muestras de 20 pacientes sanos (control) y 20 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer oral. En un total de 80 muestras (40 de la saliva y la placa dental 40) *H. pylori* se detectó 13,75% (11 muestras). De las 11 muestras positivas: 63,63% fueron de secreción salival y el 36,36% de placa dental. Tanto la muestra de saliva como la de placa dental, en 2 pacientes con diagnóstico de cáncer oral en piso de boca, resultaron



positivas. **Conclusión.** No existe evidencia suficiente para asegurar que la presencia de *Helicobacter pylori* influya en un riesgo directo a la presencia de cáncer. Sin embargo, se puede deducir que *H. pylori* puede estar situado más a menudo en la saliva y en los pacientes con cáncer oral de piso de la boca.



ABSTRACT

Helicobacter pylori is a microaerophilic bacteria, gram-negative, spiral shaped and mobile which is believed to be one of the main factors responsible for gastritis, gastric ulcers and gastric cancer. *H. pylori* has direct cytotoxic properties that are harmful to the tissues, it was found that the bacterium causes the release of phospholipase A2, proteases and lipases. Chronic inflammation contributes eventually produced or may be causal of malignant changes in some cases.

Objective. We looking for a direct relationship of *Helicobacter pylori* as a predisposing factor for oral cancer. **Materials and methods.** We analyzed 40 patients, 20 healthy patients and others 20 with oral cancer. 2 samples each, a sample of saliva secretion and other dental plaque, 20 control (healthy patients) and 20 with diagnosed with oral cancer. Were taken aseptically, placed in a special culture medium. After 4 days of incubation, replanting is carried out and incubated for 4 days. Subsequently, DNA extraction takes place from 80 crops to be confirmed by real-time PCR, the presence of *Helicobacter pylori*. **Results** A total of 80 samples (40 of saliva and 40 dental plaque), *H pylori* was detected 13.75% (11 samples). Of the 11 positive samples: 63.63% of salivary secretion and 36.36% of dental plaque. The saliva sample and dental plaque of 2 patients diagnosed with oral cancer floor of mouth were positive. **Conclusion.** In our research we found no support for claiming that the presence of *H. pylori* could be considered as a predisposing factor in the presence of oral cancer. However, we can deduce that *H pylori* may be located more frequently in saliva and in patients with oral cancer floor of mouth.



INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 7,6 millones de defunciones, aproximadamente un 13% del total (GLOBOCAN 2008 IARC). El cáncer, desde el punto de vista biológico, es un trastorno caracterizado por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular; su consecuencia es el desarrollo de una clona que puede invadir y destruir los tejidos adyacentes, y diseminarse hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias u ocurre propagación metastásica. Con frecuencia esta anomalía conduce a la muerte del individuo por deterioro de la función de los órganos vitales. Cáncer es un término genérico empleado para referirse a más de un centenar de enfermedades distintas, con epidemiología, origen, factores de riesgo, patrones de diseminación, respuesta al tratamiento y pronóstico diversos. Para los profesionales de la salud, el cáncer representa un desafío cuando se trata de devolver la salud al paciente (Granados y col. 2010)¹.

Epidemiología y etiología del Cáncer

Los estudios epidemiológicos han identificado un gran número de factores de riesgo, o sucesos relacionados con la aparición de cáncer, que con frecuencia no son la causa directa, sino indicadores de los factores reales. En contraste, los agentes etiológicos son el origen directo de la transformación maligna y desencadenan diversos mecanismos, genéticos y bioquímicos, que conducen a la



aparición de un tumor, proceso al que se le conoce como carcinogénesis u oncogénesis. La génesis del cáncer es multifactorial, pero sin duda el agente etiológico individual más importante es el tabaco, aunque los detalles del mecanismo no se conocen por completo. Otros factores etiológicos relevantes son los agentes ambientales, como los rayos ultravioleta de la luz solar o las radiaciones ionizantes emitidas por yacimientos de materiales radiactivos. Estos agentes pueden evitarse, pero no el envejecimiento ni otros procesos vitales, los cuales incrementan la generación de radicales libres y fragmentos de moléculas de reactividad química que, al reaccionar con el DNA, pueden dañar y mutar de forma permanente el gen. Otros factores causales del cáncer, como los virus, parecen actuar distinto: aceleran la tasa de división celular o inhiben la reparación o eliminación de los genes mutados. Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (VPH) y bacterias como *Helicobacter pylori* son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (Shah y col. 2001, Granados y col. 2010, OMS 2012)^{1, 2}. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030 (OMS 2012).

Manifestaciones clínicas

No existen manifestaciones típicas de cáncer. Los signos son consecuencia de la localización y volumen del tumor primario, sus efectos a distancia por la presencia de enfermedad metastásica o la acción de las sustancias que libera la



masa y que alteran la función de órganos distantes (síndromes paraneoplásicos). Por desgracia, muchos de los tumores localizados son asintomáticos y cuando producen manifestaciones, sus repercusiones son de tal magnitud que limitan la posibilidad de curación.

Diagnóstico

La primera condición para diagnosticar cáncer es sospecharlo; esto se confirma mediante estudio histopatológico antes de instruir cualquier tratamiento, aunque algunas veces el diagnóstico histopatológico se establece hasta realizar un estudio transoperatorio o mediante el estudio definitivo de la pieza quirúrgica. En circunstancias especiales, el diagnóstico y el tratamiento se delinear mediante determinaciones de marcadores tumorales con un cuadro clínico consistente. Es importante destacar que las pruebas tienen indicaciones específicas y que sus resultados se deben traducir en decisiones terapéuticas o información pronóstica precisa. La selección de estudios inapropiada conduce a erogaciones infructuosas, retrasos en el diagnóstico, morbilidad, terapia inadecuada y deterioro del pronóstico.

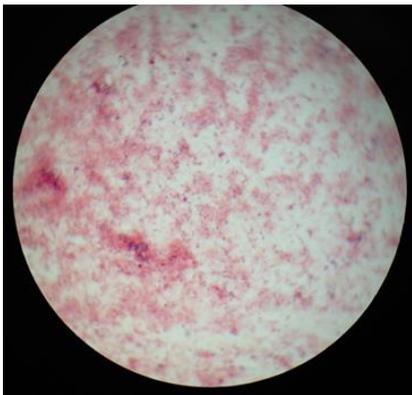
Cáncer oral

La incidencia global de cáncer de cabeza y cuello es cerca de 500,000 casos por año, con una mortalidad de 270,000 (Shah y col. 2001)². Las neoplasias malignas ubicadas en la cabeza y el cuello representan el 17.6% de la totalidad (108,064) de los cánceres reportados al Registro Histopatológico de las



Neoplasias en México (RHNM) en el año 2002. La letalidad estimada para el cáncer oral en México es 62.4% (Tirado-Gómez y Granados, 2007)¹. Las principales lesiones malignas encontradas en cavidad oral son: carcinoma de células escamosas, cáncer de glándulas salivales y linfomas. El carcinoma de células escamosas representa más del 90% de los cánceres orales, se estiman 7,550 muertes debidas a este tipo de cáncer por año (Kesting y col. 2009)³. Los linfomas son una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación de linfocitos en diferentes estadios de mutación. Los factores que contribuyen a estas mutaciones son agentes infecciosos como virus de Epstein-Barr, VIH, *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis C. (Triantafillion y col. 2012, Movahed y col 2011)^{4,5}

Helicobacter pylori



Helicobacter pylori es una bacteria microaerofílica, gram-negativa, con forma de espiral y móvil que se cree que es uno de los principales factores responsables de la gastritis, úlceras gastroduodenales y cáncer gástrico. Los estudios han identificado el microorganismo en la placa dental y saliva, que implican que la cavidad oral puede ser un reservorio para *H. pylori* o como una posible vía de transmisión a otros sitios, por lo que se considera como un reservorio extragástrico para *H. pylori*, que puede conducir a la infección gástrica recurrente (Al Asqah y Col, Suzuki y col., Rajendran y col. 2009)^{7, 25, 28}. Desde su descripción original por WARREN Y MARSHAL en 1983, el *Helicobacter*



pylori sigue siendo materia de controversia en el literatura mundial, en lo que respecta a su patogenia en gastritis, enfermedad ácido-péptica y malignidad gástrica (Warren 1984)⁸.

El *H. pylori* es una bacteria que se describe en forma de golondrina en vuelo, que coloniza el epitelio gástrico por medio de sus pedículos, se mantiene bajo la protección de una capa de moco, lo cual la protege adecuadamente de la acidez gástrica, así mismo metaboliza urea para liberar amonio y en esta forma es capaz de neutralizar el ácido agresivo del medio gástrico. Es poco probable que este microorganismo sea un simple comensal, ya que este componente plasmático celular en la gastritis crónica produce una inmunoglobulina específica: IgG, los anticuerpos que se detectan son mediadores de la actividad neutrofílica, lo cual sugiere inflamación activa. El *H. pylori* tiene propiedades citotóxicas directas que son dañinas para los tejidos y que alteran tanto in vitro como in vivo, como es la liberación de fosfolipasa A2, proteasas y lipasas.

Incidencia de *Helicobacter pylori*

Estudios serológicos retrospectivos y prospectivos han demostrado que la incidencia de *H. pylori* aumenta con la edad (Spee y col 2010)²⁰, siendo en los países desarrollados detectado muy raramente antes de los veinte años, mientras que en los países tercermundistas la incidencia en niños de diez años es arriba del 50% esto correlaciona la incidencia del microorganismo infectante con las malas condiciones sanitarias (Medina y col. 2010)²³. La forma como se transmite el *H.*



pylori es por vía oral o feco-oral y se ha demostrado una alta incidencia de la infección en los padres de niños sintomáticos en comparación con los padres de niños serológicamente negativos que sugiere altamente la transmisión intrafamiliar (Zúñiga 1999)⁹. En México, Torres y colaboradores encontraron una seroprevalencia de 70% para *H. pylori* en 11,605 muestras sanguíneas de personas de diversas edades (1 a 90 años de edad). En esta misma serie, a la edad de un año, 20% de niños fueron positivos (Torres y col. 2001)¹⁰.

***Helicobacter pylori* y cáncer**

Helicobacter pylori se ha asociado con varias enfermedades benignas y malignas del tracto gastrointestinal. *H. pylori* es ahora una causa conocida de las úlceras gástricas y duodenales, adenocarcinoma gástrico no-cardia y linfoma MALT gástrico. Además, los estudios epidemiológicos han investigado la asociación entre *H. pylori* y otros cánceres gastrointestinales, incluyendo el cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y cáncer de esófago (Islami y Kamangar et al 2008)^{26, 27}. Estudios serológicos de grandes grupos de pacientes han estimado una relación con *H. pylori* que estadísticamente triplica el riesgo de cáncer, especialmente en población de bajo nivel socioeconómico¹². La asociación de la infección por *H. pylori* con el cáncer gástrico genera nuevas interrogantes (Epplein y col. 2008, Lee y col. 2009)^{21, 22}. Como se sabe, los virus oncogénicos inician y promueven la transformación celular mediante la integración de los oncogenes codificados por el virus en el genoma del huésped. El *H. pylori* sigue siendo principalmente extracelular y no integra su genoma en el ADN del huésped, sin



embargo, la bacteria puede afectar el funcionamiento de las células huésped por translocación de una proteína bacteriana (CagA). En las células del huésped, CagA interactúa con un número de complejos celulares implicados en la oncogénesis, aunque desafortunadamente esto no se ha podido documentar en estudio con ratones. A medida que la CagA también induce citosinas proinflamatorias a través del reconocimiento de peptidoglicano de la bacteria intracelular (molécula NOD1), la progresión del cáncer se puede producir mediante la sinergia con la respuesta inflamatoria del huésped. Si bien no puede CagA promover el cáncer en sí, la exposición constante de CagA podría activar cambios hereditarios en la célula huésped (genéticos o epigenéticos) que en conjunto contribuyen a la progresión del cáncer. Esto es claro, el *H. pylori* debe ser eliminado en los casos de enfermedad de úlcera péptica, linfoma MALT (tejido linfóide asociado a mucosa) gástrico, cáncer gástrico precoz, familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico y dispepsia no investigada en poblaciones de alta prevalencia (Dorer y col. 2009)¹³.

Helicobacter pylori ha demostrado tener una actividad ureasa y producir amoníaco en el estómago. Según el estudio de Tsujii y colaboradores, donde se comprobó el papel del amoníaco en la carcinogénesis gástrica inducida por N - metil- N' -nitro -N- nitrosoguanidina (MNNG) en ratas. Éste refiere que después de 24 semanas con tratamiento previo MNNG (83 mg/l), 0,01 % de amoníaco en agua del grifo como agua potable, las ratas tratadas mostraron una incidencia significativamente mayor de cáncer gástrico. El amoníaco parece tener un papel



importante en *H. pylori* relacionados con la carcinogénesis gástrica humana (Tsuji y col. 1992)¹⁴.

A pesar de que *Helicobacter pylori* es ahora reconocida como factor etiológico en la gastritis crónica y úlcera péptica, la información sobre la patogénesis y la historia natural de la infección es limitada. Blaser propone un modelo en el que se esquematiza la acción de esta bacteria. *H. pylori* secreta sustancias que median en la inflamación lo que es beneficioso para el organismo pero en última instancia perjudicial para el huésped, además de daños en los tejidos, la inflamación también afecta la función secretora gástrica. En este modelo, el huésped puede tratar de suprimir la respuesta inflamatoria y la adecuación de éste a la regulación, esto determina el resultado patológico y clínico. Los efectos del proceso inflamatorio en la homeostasis del ácido clorhídrico y gastrina pueden ser de importancia crítica en la patogénesis de la enfermedad ulcerosa péptica. Debido a las consecuencias a largo plazo de la colonización por *H. pylori* reflejar la presencia continua del organismo en el huésped durante años o décadas, puede ser útil para considerarlo como una infección crónica bacteriana. De acuerdo a este modelo el *H. pylori* que reside en el gel mucoso libera una serie de productos que dan por resultado una inflamación crónica, ésta a su vez afecta a largo plazo la secreción gástrica y la función parietal en sí, aunque mecanismos supresores inmunológicos pueden interferir e incluso abortar esta cascada, el paso final es la producción de una gastritis crónica activa, úlcera duodenal recurrente, úlcera gástrica y atrofia gástrica que eventualmente en un número de casos contribuye o puede ser causal de cambios



malignos durante este proceso final de atrofia gástrica que se inicia en el antro, pero que se moviliza proximalmente al cuerpo y fondo del estómago, se produce tal grado de atrofia gástrica que no es habitable para la bacteria y lo único detectable, desde el punto de vista diagnóstico, son las secuelas inmunológicas en las que se han basado casi todos los estudios que apuntan a *H. pylori* como agente causal del cáncer gástrico (Blaser y col. 1992)¹⁶.

Se han descrito casos donde pacientes con linfomas MALT gástrico se encuentran asociados a linfomas en parótida. También, se demuestra que la erradicación de *H Pylori*, en casos donde el linfoma es de bajo grado, ha resultado en la remisión de la lesión. Sin embargo, se ha observado que en los casos donde hay mayor resistencia a la erradicación de la *H pylori*, el linfoma ha mostrado un curso clínico más agresivo (Yamamoto 2003, Iwai 2009, Berthold 2004)^{17, 18, 19}.

Se continúan investigando los mecanismos relacionados con la capacidad de *H. pylori* de producir cáncer. Los mecanismos por los cuales *H. pylori* provoca cáncer gástrico pueden igualmente producirse en la mucosa oral. En un estudio realizado por Alder y colaboradores se demostró una asociación entre *H. pylori*, glositis, halitosis e hiperplasia lingual (87% de la muestra resultó positivo) y se consideró además a esta bacteria como un factor de riesgo para la infección gástrica (Alder et.al.2005)¹⁵. Se considera un mecanismo que involucra la posibilidad de generar radicales libres asociada a una infección de *H. pylori*, la cual produciría un aumento en la tasa de mutación de la célula huésped. Otro mecanismo ha sido llamado ruta epigenética e involucra la transformación del



fenotipo de la célula huésped por medio de alteraciones en proteínas celulares tales como las proteínas de adhesión CagA y VacA. Se ha propuesto la posibilidad de que *H. pylori* induzca inflamación y niveles localmente altos de TNF-alfa o interleucina 6. De acuerdo con el mecanismo epigenético propuesto, las moléculas señalizadoras de inflamación, tales como TNF-alfa, podrían alterar la capacidad de adhesión de las células epiteliales del estómago y conducir a la dispersión y migración de estas células epiteliales mutadas, sin necesidad de alteraciones adicionales en genes supresores de tumores (Tsuji y col. 2003)⁶.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La relación cáncer oral y *Helicobacter pylori* ha sido poco investigada, como ejemplo se encuentran los resultados en el estudio piloto realizado por Dayama y colaboradores en 2011, no son concluyentes. Sin embargo, la presencia de *Helicobacter pylori* en boca sigue siendo materia de investigación, al igual que la fisiopatología del cáncer para encontrar así métodos preventivos.

La recopilación de muestras y obtención del ADN de *Helicobacter pylori* en pacientes específicos como los que se desea para esta investigación, proyecta un tiempo de trabajo de octubre de 2010 hasta el procesamiento de los resultados en diciembre de 2013. La primera etapa de toma de muestra se realiza en la consulta externa del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial y del servicio de Oncocirugía; la siembra de muestras, extracción de material genético y el PCR en tiempo real se llevará a cabo en el laboratorio de Biología Molecular y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud.

Posterior a analizar lo antes expuesto, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué relación existe entre la presencia de *Helicobacter pylori* y el cáncer oral?



JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, para el año 2025 se estima que habrá 15.5 millones de casos nuevos de neoplasias malignas. La letalidad estimada para el cáncer de vías aerodigestivas en México es: cavidad bucal 62.4%, laringe: 93%, bucofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y, fosas nasales y senos paranasales 47%.

Al observar la problemática de salud que representa el cáncer a nivel mundial, es necesario llevar a cabo investigaciones que aporten información sobre los factores que predisponen a neoplasias malignas, ya que así se contribuye a bajar los niveles de morbilidad y mortalidad de este tipo de enfermedades. Por lo anterior, este estudio está enfocado a determinar la relación entre la presencia de *Helicobacter pylori* en la secreción salival y en placa dental como un factor predisponente en las neoplasias malignas que se encuentran en la cavidad bucal y anexos como son las glándulas salivales.

Con los resultados obtenidos se espera encontrar una relación directa entre la presencia de *Helicobacter pylori* en cavidad bucal con la aparición de cáncer en la misma región. Y teniendo en consideración que estudios hechos a nivel gástrico reportan que la erradicación de esta bacteria ha contribuido a disminuir el cáncer gástrico, el objetivo es saber si con la disminución de *Helicobacter pylori* en cavidad oral se logra disminuir o frenar el avance de tumores cancerígenos en esta región.



La importancia de este trabajo radica en que si se logra comprobar la relación de *Helicobacter pylori* y cáncer oral, la disminución de este microorganismo podría ser un coadyuvante en los tratamientos conservadores contra tumores malignos.

De lograr lo aquí expuesto se beneficiaría a toda la población, ya que se podría saber que controlando la proliferación de esta bacteria, se lograría disminuir, detener o en el mejor de los casos, prevenir las neoplasias malignas dependientes de proliferación de *Helicobacter pylori*.



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existe una relación directa entre la colonización de *Helicobacter pylori* en cavidad oral con la presencia de neoplasias malignas de esta misma región.

Objetivos específicos

- Identificar en muestras de saliva y placa dental subgingival la presencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con cáncer oral.
- Asociar la presencia de *Helicobacter pylori* en cavidad oral con neoplasias malignas que se presentan en boca.



HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

No existe una relación entre la colonización de *Helicobacter pylori* en cavidad oral y la presencia de neoplasias malignas de esta misma región.

Hipótesis Alternativa

Existe una relación entre la colonización de *Helicobacter pylori* en cavidad oral y la presencia de neoplasias malignas de esta misma región.



MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El presente es un estudio prospectivo, longitudinal, observacional acerca de la asociación de la presencia de *Helicobacter pylori* y cáncer oral, donde se analizaron muestras de secreción salival y placa dental en busca de la presencia de *Helicobacter pylori* y asociando la existencia de esta bacteria con neoplasias de tipo maligno en cavidad oral y glándulas salivales.

Periodo de estudio

Octubre de 2010 a Diciembre 2013

Lugar de estudio

- Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”
- Unidad Médica de Alta Especialidad no. 25 IMSS
- Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Nuevo León.



Población de estudio

Pacientes mayores de 18 años de edad, en donde es más probable encontrar infección por *Helicobacter pylori*, que accedan a formar parte de este estudio; con diagnóstico de cáncer oral.

Se sometieron al estudio 20 pacientes, con diagnóstico de cáncer oral, de los que se tomó muestra de secreción salival y de placa dental y se comparó con muestras del mismo tipo en 20 pacientes sanos.

Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de cáncer oral (casos).
2. Pacientes mayores de 18 años sanos (control).
3. Pacientes que accedan a participar en el estudio y que firmen de aceptación la carta de consentimiento informado.
4. No haber tomado antibiótico por los menos en los últimos 30 días.

Criterios de exclusión

1. Pacientes sin diagnóstico bien documentado de cáncer oral (casos).
2. Pacientes menores de 18 años.
3. Pacientes con datos clínicos de enfermedad periodontal o amigdalitis.
4. Pacientes que no accedan a la toma de muestras.



5. Pacientes con obesidad.

Variables

- Dependiente
 - Presencia de *Helicobacter pylori* en saliva y placa dental
- Independiente
 - Cáncer oral

Tamaño de muestra

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cualitativa (*Presencia de Helicobacter pylori*) donde además, se trata de una población infinita se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 pq}{e^2}$$

Para el presente proyecto se han determinado los siguientes valores los cuales han sido definidos con base en el artículo "*Detection of Helicobacter pylori DNA in the saliva of patients complaining of halitosis*" y fueron aplicados para determinar el tamaño de la muestra bajo la siguiente fórmula:

z= 1.96 para 95% confiabilidad



$p=0.15$

$e=0.11$

Para obtener el tamaño de la muestra se sustituyen los valores y se obtiene que:

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.15)(0.85)}{(0.11)^2} \quad n = 40.48 \approx 40$$

De aquí se obtiene que el número total de muestras del estudio fué de 40, las cuales debieron cumplir los criterios de inclusión, exclusión y eliminación establecidos; para ello fueron seleccionados 20 pacientes a los cuales se les realizaron dos procedimientos que consistieron en la obtención de una muestra de saliva y otra de placa dental.

Procedimientos:

Para el grupo control, se buscaron 20 pacientes sanos que cumplieran con los criterios de inclusión. En cuanto a los casos, se solicitó la participación de 20 pacientes con diagnóstico previo de cáncer oral en cualquier subsitio (lengua, piso de boca, glándulas salivales mayores, mandíbula, entre otros), que acudieron por primera vez a la consulta del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial en el Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda” y al servicio de Oncocirugía de Cabeza y Cuello en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 25 de Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los pacientes fueron diagnosticados



mediante biopsia por aspiración de aguja fina (BAAF) o biopsia incisional, las muestras se tomaron previo a tratamiento farmacológico o quirúrgico alguno.

Toma de muestras

Se tomaron muestras de secreción salival (20 μ l) con una micropipeta directamente de piso de boca, y se colocaron en medio de cultivo propio para el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Así mismo, con una cureta estéril se tomó la muestra de placa dental en el surco gingival del primero o segundo molar inferior derecho, muestra que se depositó en 100 μ l de medio de cultivo de tripticaseína de soya enriquecido con suero equino, se homogenizó para colocarla inmediatamente en placas de cultivo propio para la proliferación de *Helicobacter pylori* (adicionado con antibióticos para evitar proliferación de gram+), tomando toda la muestra y dejándola caer en medio de la placa, sin estriar. Se incluyeron las placas dentro de un recipiente hermético, dentro de éste se colocó un sobre para producción de CO₂ (Gas Pack) y se incubó por 4 días a 37°.



Toma de muestra de saliva

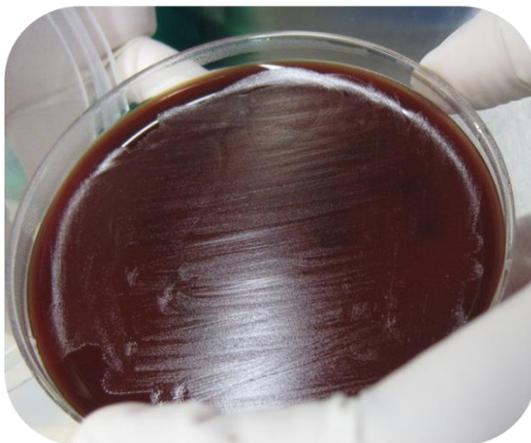


Muestra de placa dental

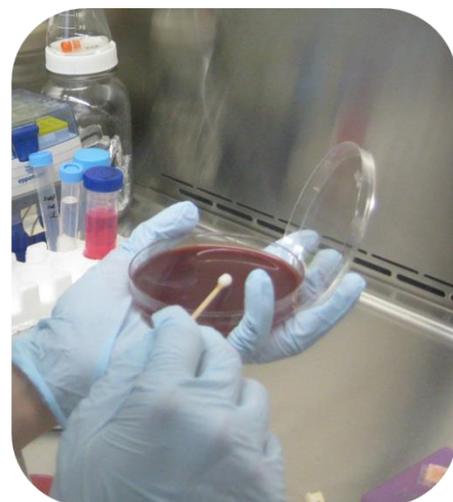
Posteriormente, se revisaron los cultivos en busca de crecimiento de colonias de *Helicobacter pylori*, caracterizadas por ser incoloras, transparentes con apariencia de “gotas de rocío”, se humedeció un hisopo estéril en solución estéril, se tomaron la colonia de *H. pylori* y se realizó nuevamente otro cultivo exclusivamente de esta bacteria, se colocaron las placas dentro de un recipiente hermético, dentro de éste se añadió un sobre para producción de CO₂ (Gas Pack) y se incubó nuevamente por 4 días a 37°. Luego, se recogió todo el crecimiento de *H. pylori* y se realizó tinción y detección de ADN para confirmar la presencia de esta bacteria.



Colocación de muestra en medio de cultivo



Colonia *H. pylori*



Toma de colonia de *H. pylori*



Extracción de ADN por columna Promega

Se procedió a suspender el pellet bacteriano añadiendo 175ul de Buffer de lisis y 100ul de lisozima, en un tubo eppendorff de 1.5ml, el cual se incubó a 37°C durante 24 hrs. Posteriormente se añadió 350ul de buffer de dilución, se mezcló por inversión del tubo 3 veces. Se Incuba a 70°C durante 3 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorff limpio y se colocó una columna en un tubo de recolección. Se agregó 200ul de etanol 96° al sobrenadante recuperado y se mezcló por inversión del tubo 3 veces. La mezcla del paso anterior se aplicó a la columna y se centrifugó a 8000 r.p.m. por un minuto. Se procedió a descartar el sobrenadante y se añadió 500ul de buffer de lavado. Se centrifugó a 8000 r.p.m. por un minuto. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se centrifugó a 14000 r.p.m. por 3 minutos para secar la membrana y eliminar restos de etanol. Se retiró nuevamente el sobrenadante con todo y tubo. Se rotuló un tubo eppendorff estéril y colocó la columna en él. Se eluyó el ADN unido a la membrana con 20ul de agua destilada estéril aplicándola directamente en el centro de la membrana. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 r.p.m. por un minuto. Se desechó la columna y se tapó el tubo conteniendo el ADN. Posteriormente se guardó a -20°C hasta su empleo para la amplificación por PCR.

Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar *Helicobacter pylori*

El ADN previamente extraído y purificado por ambas técnicas se amplificó por PCR en tiempo real con oligonucleótidos y sonda específicos previamente

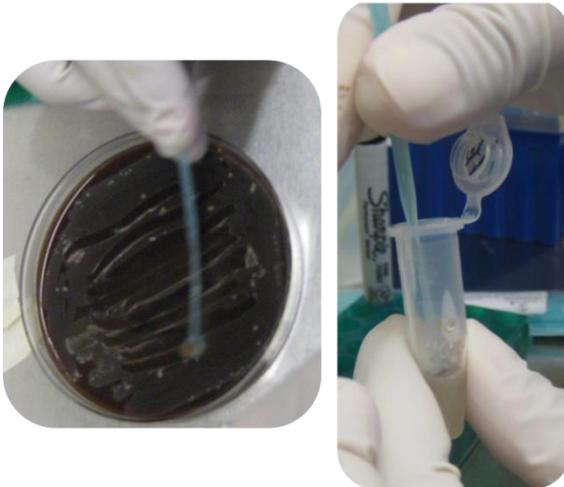


diseñados por el Dr. Claudio Cabral Romero usando el programa primer Express 3.0 (Applied Biosystems) y dirigidos al ADN de la subunidad ribosomal 16S de *H. pylori*.

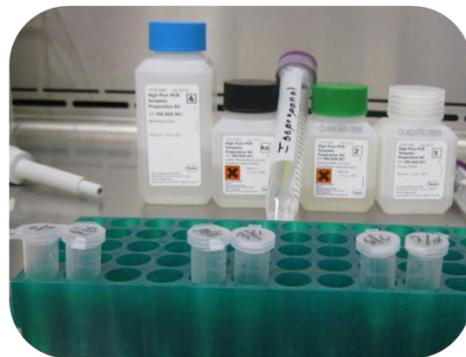
Sonda: 5'-/56-FAM/AGGCTGCAA/ZEN/CTCGCCTGCATGA/31ABkFQ/-3'M

Primer 1 5'-AAAACACCTCTCAGTTCGGATTG-3''

Primer 2 5'-TTTGCGATTACTAGCGATTCCA-3'



Toma de colonia *H. pylori* y dilución



Reactivos para extracción ADN

Programa del Termociclador

Se utilizó el aparato Light-Cycler 408II de la marca Roche. Se programó en modo de detección HRM Dye, con tipo de bloque de 96 y un volumen de reacción de 20 ul. Para la mezcla y condiciones de reacción se empleó el Kit Universal TaqMan Master Probe I. Trabajando en la campana de flujo laminar, se descogelaron los viales sobre hielo y se centrifugaron antes de usar. Se hizo un mix que contenía 2ul de agua esteril grado PCR, 0.250 ul de primers-sonda stock



10x y 5ul de PCR Master mix 10x, que se añadieron de forma secuencial a los pocillos. Finalmente se añadió 5ul de ADN templado para los experimentales, o bien agua para los pocillos de control negativo, todo esto para completar una concentración final de 25ul.

| Reactivo | 1X (ul) |
|---------------------|----------------|
| Agua estéril grado | |
| PCR | 4 |
| Primers-sonda Stock | |
| 10X | 0.250 |
| PCR Master Mix 10X | 5 |
| DNA templado | 5 |

Los programas fueron tres: pre-incubación con 1 ciclo, amplificación con 50 ciclos y modo de análisis en cuantificación y por último de enfriamiento con un ciclo.

| Formato de detección | Tipo de bloque | Volumen de reacción |
|----------------------|----------------|---------------------|
| HRM Dye | 96 | 20 ul |
| Programas | | |
| Tipo de programa | Ciclos | Modo de Análisis |
| Pre-incubación | 1 | - |
| Amplificación | 50 | Cuantificación |
| Enfriamiento | 1 | - |



La preincubación se realizó a una temperatura de 95°C, con hold de 5 minutos y una rampa de 4°C/S, la amplificación se llevó a cabo con 3 distintas temperaturas: de 95°C con un hold de 10 segundos y una rampa de 4°C/S; de 55°C con un hold de 15 segundos y una rampa de 2°C/S; y por último de 72°C con un hold de 10°C/S, con una rampa de 4°C/S y un modo de adquisición single. El programa de enfriamiento fue con una temperatura de 40°C, un hold de 30 segundos y una rampa de 2.

| Programa | Hold hh:mm:ss | Rampa °C/S | Modo de adquisición |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Pre- incubación | | | |
| 95 | 00:05:00 | 4 | - |
| Amplificación | | | |
| 95 | 00:00:10 | 4 | - |
| 55 | 00:00:15 | 2 | - |
| 72 | 00:00:10 | 4 | Single |
| Enfriamiento | | | |
| 40 | 00:00:30 | 2 | - |

RECURSOS

Recursos físicos

- Consulta externa del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial, Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”.



- Consulta externa del servicio de Oncocirugía de Cabeza y Cuello, UMAE no. 25 IMSS.
- Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Odontología, UANL.
- Laboratorio de investigación en estomatología, CIDICS, UANL.

Recursos Humanos

- Director de tesis
- Co-director de tesis
- Asesora de investigación
- Residente de Cirugía Oral y Maxilofacial
- Química bacterióloga
- 2 Pasantes del servicio social Odontología

Recursos financieros

- Campana estéril
- Incubadora
- Centrifuga
- PCR Tiempo real
- Placa Agar Campylobacter
- Sobre Generador Gaspak EZ Campy
- SV Total RNA Isolation System
- Suero equino CTR VIN002186
- Cajas petri
- Micropipeta



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Posterior a la observación de la presencia de *Helicobacter Pilory* en saliva y placa dental, los datos se concentraron en la hoja de recolección donde se procedió a hacer el registro de cada una de las variables.

Posteriormente, los datos se capturaron en una base de datos en el programa IBM Statistics 19 con el que se realizaron tablas de frecuencia de dos variables dentro de las cuales se consideró la variable principal (presencia de *Helicobacter Pilory*) confrontada con el resto de las variables establecidas en el instrumento de observación (neoplasias malignas en cavidad oral). Para algunos procedimientos estadísticos de clasificación y manejo de base de datos utilizó el programa Microsoft Excel 2010.

El presente proyecto cuenta con un modelo estadístico de presentación de resultados que consiste en la elaboración y descripción de tablas de frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas y de intervalo, así como un modelo descriptivo de medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, además del uso de gráficos de barras con error y desviación estándar para las tablas mayormente relacionadas con el análisis de los datos, posterior a este diseño se realizó una descripción detallada de los resultados.



PRUEBA DE HIPÓTESIS

Para determinar si existe relación entre la presencia de *Helicobacter pylori* en saliva y placa dental como factor predisponente en neoplasias malignas en cavidad oral se empleó una prueba de coeficiente de **chi cuadrada**.

Dependiendo de las dimensiones de la tabla se empleó una de las siguientes estadísticas de prueba

$$\lambda^2 = \sum \frac{(f_{io} - f_{ie})^2}{f_{ie}} \qquad \lambda^2 = \sum \frac{(|f_{io} - f_{ie}| - 0.5)^2}{f_{ie}}$$

Una de las postpruebas que se utilizó para evaluar la fuerza de la asociación en caso de que los datos así lo refieran fue el **coeficiente C de Pearson para χ^2** . Este coeficiente se aplica para medir la magnitud de una relación en caso de presentarse entre dos variables y se utiliza posterior al cálculo e interpretación de una Ji cuadrada.

$$c = \sqrt{\frac{\lambda^2 c}{\lambda^2 c + n}}$$

Se aplicó la fórmula al valor obtenido de la ji cuadrada y se pudo interpretar con el siguiente criterio por lo que se determina una correlación baja para éstas variables.



| | |
|-------------|------------------------|
| < a 0.25 | Correlación baja |
| 0.26 a 0.45 | Correlación media baja |
| 0.46 a 0.55 | Correlación media |
| 0.56 a 0.75 | Correlación media alta |
| > a 0.75 | Correlación alta |

Según los resultados obtenidos se puede también emplear una **prueba exacta de Fisher** debido a que al estimar una prueba de χ^2 y observar que existe una frecuencia esperada menor a 2 o, cuando la mayoría de las frecuencias esperadas son menores a 5 significa que es momento de elegir otra prueba ya que debido a éstas dimensiones tan pequeñas de las frecuencias esperadas es incorrecto el uso de la χ^2 .

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!n!}$$



RESULTADOS

Se analizaron un total de 80 muestras (40 de la saliva y 40 de placa dental), en el grupo control se tomaron muestras al azar a 10 mujeres y a 10 hombres, entre 22 y 60 años (media de 34.25 años), los cuales no padecían de ningún tipo de enfermedad sistémica ni oral. Así mismo se tomaron muestras a 20 pacientes con diagnóstico, por BAAF o biopsia incisional, de cáncer oral en diferentes subsitios (4 en lengua, 4 en orofarínge, 3 en piso de boca, 3 en mandíbula, 2 en paladar, 2 en glándulas salivales mayores, 1 en maxilar, 1 en mandíbula y otro más con diagnóstico de linfoma en mucosa yugal lado izquierdo); entre 32 y 82 años de edad, con una media de 57.25 años. *H. pylori* se detectó 13,75% (11 muestras). De las 11 muestras positivas fueron 63,63% de la secreción salival y el 36,36% eran de la placa dental. De las 40 muestras de grupo control se encontraron 7 muestras positivas, de las cuales 71.43% fueron de secreción salival y el 28.57% restante de placa dental. En cuanto al grupo de pacientes con cáncer oral, se detectó *H. pylori* en 4 de 40 muestras (10%), 2 de secreción salival (50%) y 2 en placa dental (50%). Es importante observar que tanto la muestra de saliva como la de placa dental de 2 pacientes con diagnóstico de cáncer oral en el piso de la boca fueron positivos.



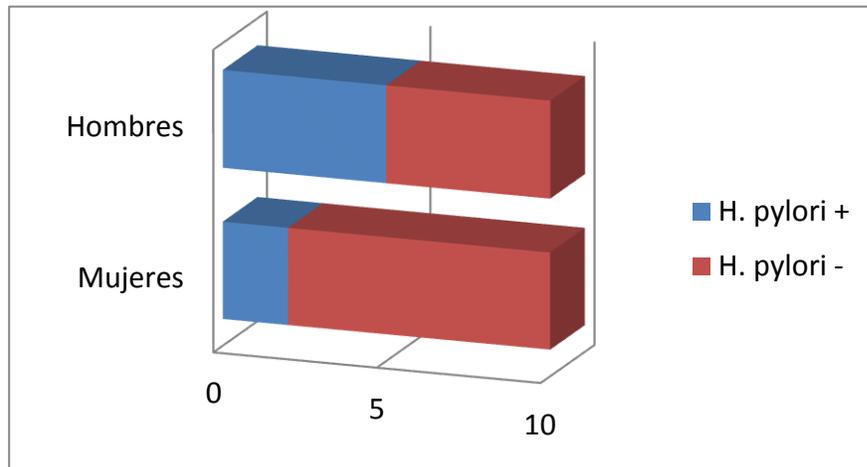
Grupo Control

| Edad | Genero | H. Pylori Placa | H. pylori Saliva |
|------|-----------|-----------------|------------------|
| 56 | Femenino | Positivo | Positivo |
| 22 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 23 | Masculino | Negativo | Positivo |
| 23 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 36 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 60 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 57 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 23 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 23 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 28 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 26 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 40 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 38 | Femenino | Negativo | Negativo |
| 30 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 27 | Masculino | Negativo | Positivo |
| 27 | Masculino | Negativo | Positivo |
| 58 | Femenino | Negativo | Positivo |
| 26 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 24 | Masculino | Negativo | Negativo |
| 38 | Femenino | Positivo | Negativo |

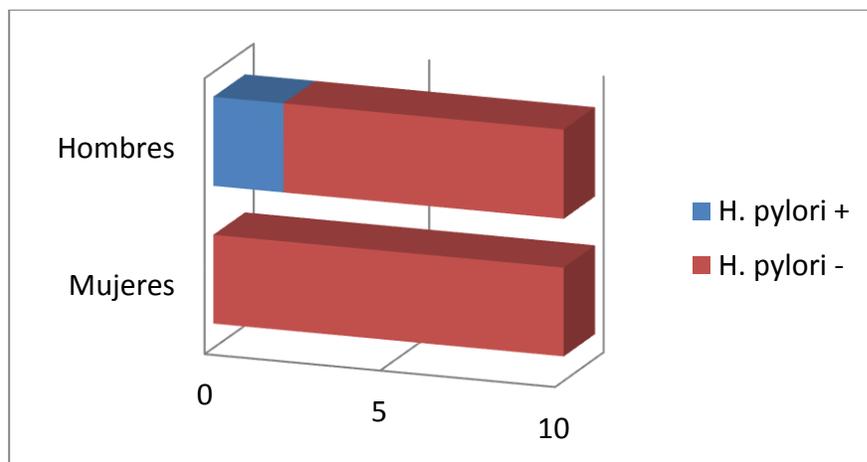


Grupo Paciente con Cáncer

| EDAD | GENERO | H. pylori placa | H. pylori saliva | CA |
|------|-----------|-----------------|------------------|--------------|
| 74 | Masculino | Negativo | Negativo | Lengua |
| 36 | Masculino | Negativo | Negativo | Lengua |
| 56 | Masculino | Negativo | Negativo | Lengua |
| 67 | Masculino | Negativo | Negativo | Parótida |
| 65 | Femenino | Negativo | Negativo | Orofaringe |
| 48 | Femenino | Negativo | Negativo | Linfoma |
| 44 | Femenino | Negativo | Negativo | Lengua |
| 77 | Femenino | Negativo | Negativo | Paladar |
| 83 | Masculino | Positivo | Positivo | Piso de boca |
| 37 | Femenino | Negativo | Negativo | Paladar |
| 32 | Masculino | Positivo | Positivo | Piso de boca |
| 56 | Femenino | Negativo | Negativo | Piso de boca |
| 32 | Masculino | Negativo | Negativo | Submadibular |
| 80 | Masculino | Negativo | Negativo | Mandíbula |
| 82 | Femenino | Negativo | Negativo | Mandíbula |
| 37 | Femenino | Negativo | Negativo | Orofaringe |
| 43 | Masculino | Negativo | Negativo | Orofaringe |
| 82 | Femenino | Negativo | Negativo | Orofaringe |
| 63 | Femenino | Negativo | Negativo | Mandíbula |
| 51 | Masculino | Negativo | Negativo | Maxilar |



Pacientes sanos



Pacientes con cáncer oral

Se aplicó un análisis estadístico para evaluar la hipótesis en el sentido de relación entre la presencia de cáncer y la presencia de *Helicobacter pylori* en el grupo de pacientes considerados en el estudio, su cálculo se realizó por medio de una tabla de contingencia o tabulación cruzada para las dos variables.

Descripción de los datos

Variable dependiente: Presencia de *Helicobacter pylori*



Variable Independiente: Presencia de Cáncer

Planteamiento de las hipótesis

H_0 : No existe relación entre la presencia de *Helicobacter pylori* y la presencia de Cáncer

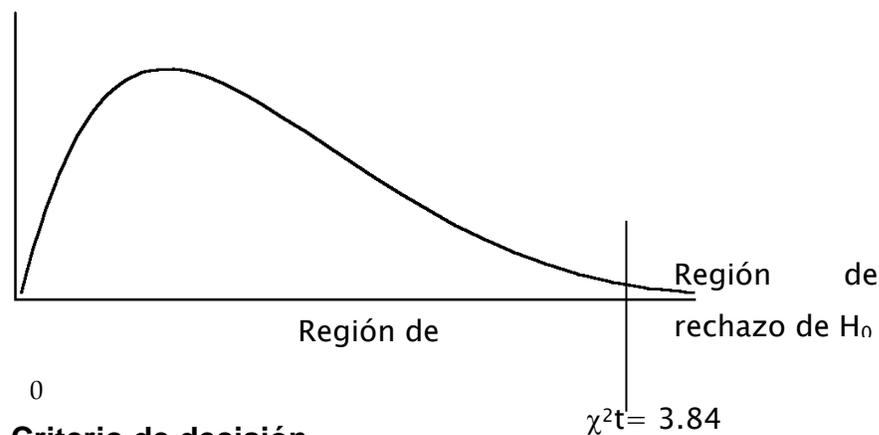
H_1 : Existe relación entre la presencia de *Helicobacter pylori* y la presencia de Cáncer

Estadística de prueba

Chi cuadrada con corrección de Yates

$$\chi^2 = \sum \frac{(|f_{io} - f_{ie}| - 0.5)^2}{f_{ie}}$$

Distribución o presentación de la prueba



Se acepta hipótesis nula si el coeficiente de χ^2 calculada es menor o igual a 3.84, se acepta hipótesis nula si el coeficiente de χ^2 calculada es mayor a 3.82

Estadística de prueba calculada

Tabla 1

Relación entre la presencia de cáncer y la presencia de H. Pylori, Junio de 2013

| Cáncer | H. Pylori | | | | | |
|--------|-----------|------|----|------|-------|--------|
| | Si | | No | | Total | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Si | 4 | 0.05 | 36 | 0.45 | 40 | 50.00 |
| No | 7 | 0.09 | 33 | 0.41 | 40 | 50.00 |
| Total | 11 | 0.14 | 69 | 0.86 | 80 | 100.00 |

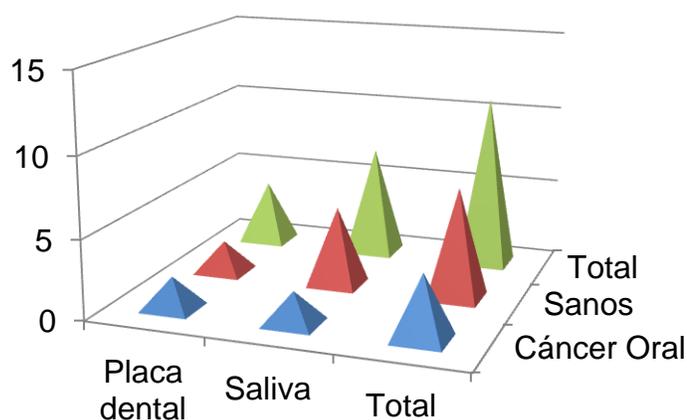
Fuente: Observación directa

Chi Yates= 0.422, $p=0.5169$

Odds Ratio=0.5238, IC_{95%}: 0.1405 a 1.9534

Riesgo Relativo=0.5714, , IC_{95%}: 0.1814 a 1.8005

Total de pacientes con H pylori positivo



- Cáncer Oral
- Sanos
- Total



DISCUSIÓN

La incidencia global de cáncer de cabeza y cuello es cerca de 500,000 casos por año, con una mortalidad de 270,000 (Shah y col. 2001)². Las neoplasias malignas ubicadas en la cabeza y el cuello representan el 17.6% de la totalidad (108,064) de los cánceres reportados al Registro Histopatológico de las Neoplasias en México (RHNM) en el año 2002. La letalidad estimada para el cáncer oral en México es 62.4% (Tirado-Gómez y Granados, 2007)¹. Las principales lesiones malignas encontradas en cavidad oral son: carcinoma de células escamosas, cáncer de glándulas salivales y linfomas. El carcinoma de células escamosas representa más del 90% de los cánceres orales, se estiman 7,550 muertes debidas a este tipo de cáncer por año (Kesting y col. 2009)³. Los linfomas son una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación de linfocitos en diferentes estadios de mutación. Los factores que contribuyen a estas mutaciones son agentes infecciosos como virus de Epstein-Barr, VIH, *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis C y así sucesivamente (Triantafillion y col. 2012, Movahed y col 2011)^{4,5}.

Existen resultados contradictorios sobre el papel de la placa dental como una fuente de infección de *Helicobacter pylori* con una tasa de detección que van desde 0% a más del 90%. Las grandes variaciones en la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral probablemente se originan en las diferencias metodológicas entre los estudios. Eskandari y colaboradores demostraron que la prevalencia de la infección por *H. pylori* en la placa dental es muy baja, pero puede ser



considerada como posible fuente de reinfección después del tratamiento de la gastritis. (Eskandari y col. 2010)²⁴.

En este trabajo se analizó la posible asociación entre la presencia de *H. pylori* y cáncer oral. Los resultados obtenidos no mostraron una asociación directa, ya que se detectaron más casos positivos de *H. pylori* en el grupo control, que en el grupo experimental con cáncer. Como se menciona en el párrafo anterior, se ha sugerido previamente una posible participación de *H. pylori* en la génesis del cáncer oral, aunque la evidencia aun no es contundente. Muchos trabajos que apoyan esta hipótesis realizaron la detección de *H. pylori* por métodos enzimáticos los cuales tienen mucho margen de error, ya que existen muchas otras bacterias (como *Campylobacter*) que podrían arrojar falsos positivos. Se planteó en la hipótesis que el desarrollo de las neoplasias malignas orales al ser multifactorial es difícil poder acuñar la etiología solamente a la presencia de un microorganismo, ya que muy probablemente debe estar vinculado a una susceptibilidad del huésped, así como a otros factores como el genético y bioquímico.

Los resultados del estudio piloto realizado por Dayama y colaboradores, con una muestra similar a la considerada en el presente trabajo, indican que las probabilidades de que los cultivos de *H. pylori* positivos, confirmados por PCR, puedan desarrollar cáncer oral son 1.6 y 3.0. Por lo que concluyen que se necesitan estudios con muestras más amplias para cuantificar plenamente la asociación entre *H. pylori* y el cáncer oral. Además de que sugieren aumentar la conciencia en la población con respecto a la higiene dental, ya que la falta de



cepillado se ha asociado con un aumento del riesgo de infección oral, resultando en inflamación e infección crónica, que puede ser importante en la patogénesis del cáncer³⁰.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor prevalencia de *H. pylori* en saliva, más que en placa dental. Este dato es interesante, ya que al ser una bacteria microaerófila, se esperaba que su detección fuera más frecuente en placa dental. Se asumió que a través de la saliva podría ser el medio de transporte para llegar a estómago y establecer su colonización en dicho lugar. Algo interesante a demostrar sería si se trata de la misma cepa que causará cáncer estomacal con el transcurso del tiempo.

En el estudio de Momtaz y colaboradores menciona que existen varias hipótesis que pueden explicar la baja tasa de *H. pylori* en la cavidad oral en comparación con la biopsia gástrica y muestras de heces, ya que puede estar relacionado con la presencia de la flora oral normal, la cual es capaz de afectar el crecimiento de *H. pylori* mediante la producción de bacteriocina como proteínas inhibitoras contra las cepas de esta bacteria. Observaron que *H. pylori* es polimórfica, la diversidad de los genotipos entre estómago, heces y saliva en el mismo paciente sugieren que más de una cepa de *H. pylori* pueden existir en la saliva y el estómago de la misma paciente debido a co-infección o variación genética²⁹.



En conclusión, los datos obtenidos no apoyan un rol etiológico para *H. pylori* en el desarrollo de neoplasias malignas orales en los pacientes analizados.

CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto se asegura con un 95% de confiabilidad que no existe relación estadísticamente significativa entre la colonización de *Helicobacter pylori* y la presencia de cáncer oral.

No existe evidencia suficiente para asegurar que la presencia de *Helicobacter pylori* influya en un riesgo directo a la presencia de cáncer oral.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Granados García M., Herrera Gómez A. **Manual de Oncología. Procedimientos Médico Quirúrgicos.** Cuarta Edición. Instituto Nacional de Cancerología. Mc Graw Hill. México 2010.
- 2) Shah J. P. **Atlas of Clinical Oncology Cancer of the Head and Neck.** American Cancer Society. BC Decker Inc. New York USA. 2001.
- 3) Kesting M. R., Schurr C., Robitzky L., Steinstraesser L., Nieberler M., Baurecht H., Wolff K., Loeffelbein D. J., Mücke T. **Results of Esophagogastroduodenoscopy in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma-Value of Endoscopic Screening: 10-Year Experience.** J Oral Maxillofac Surg 67:1649-1655, 2009).
- 4) Triantafillidou K., Dimitrakopoulos J., Iordanidis F., Gkagkalis A. **Extranodal Non-Hodgkin Lymphomas of the Oral Cavity and Maxillofacial Region: A Clinical study of 58 Cases and Review of the Literature.** J Oral Maxillofac Surg xxxxx, 2012.
- 5) Movahed R., Weiss A., Velez I., Dym H. **Submandibular Gland MALT Lymphoma Associated With Sjögren´s Syndrome: Case Report.** J. Oral Maxillofac Surg 69:2924-2929, 2011.
- 6) Tsuji S, Kawai N, Tsujii M, Kawano S, Hori M. **Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis--a perigenetic pathway.** Aliment Pharmacol Ther. 2003 Jul;18 Suppl 1:82-9
- 7) Mohammed Al Asqah BDS, Nawaf Al Hamoudi BDS, Sukumaran Anil BDS PhD, Abdulrahman Al jebreen MD FRCPC, Waleed Khalid Al-hamoudi MD. **Is the presence of *Helicobacter pylori* in the dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection?** Can J Gastroenterol Vol 23 No 3 March 2009
- 8) Marshall BJ, Warren JR. **Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.** Lancet 1984; 1:1311-4.
- 9) *Zúñiga Gustavo.* **Helicobacter Pylori.** REVISTA MEDICA HONDUREÑA - VOL. 60 -199.
- 10) Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gómez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R *et al.* **A Community-Based Seroepidemiologic Study Of *Helicobacter Pylori* Infection In Mexico.** J Infect Dis 1998;178(4): 1089-1094.
- 11) Belkind-Gerson Jaime, Basurto Gloria, Newton Oscar, Avila-Figueroa Carlos, Del Río Carlos. **Incidencia de infección por *Helicobacter pylori***



en una cohorte de lactantes en el estado de Morelos. Salud pública Méx vol.43 no.2 Cuernavaca Mar./Apr. 2001.

- 12) Nomura A, Stemmermann G et. al. **Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii.** New Eng. J. Med 1991;325:1132-36.
- 13) Dorer Marion, Talarico Sarah, Salama Nina. **Helicobacter pylori's Unconventional Role in Health and Disease.** October 2009. Volume 5. Issue 10.
- 14) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Nagano K, Ito T, Hayashi N. **Ammonia: a possible promotor in helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis.** Cancer Lett. 1992 Jul 31;65(1):15-8.
- 15) Adler I, Denninghoff VC, Álvarez MI, Un Avagnina, Yoshida R, Elsner B. **Helicobacter pylori, asociado a la glositis y la halitosis.** 2005 Aug; 10 (4) :312-7 .
- 16) Blaser MJ. **Hypotheses on the pathogenesis and natural history of Helicobacter pylori-induced inflammation.** Gastroenterology. 1992 Feb;102(2):720-7.
- 17) Yamamoto Y, Onizuka Yamochi, Shiozawa E, Kushima M, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kaneko K, Mitamura K, Hoshino M, Ishii H, Kusano M, Ota H. **Discordant lymphoma: MALT lymphoma of the stomach and follicular lymphoma of the parotid gland.** Pathol Int. 2003 Aug; 53 (8):557-62.
- 18) Iwai H, Nakamichi N, Nakae K, Konishi M, Inaba M, Hoshino S, Baba S, Amakawa R. **Parotid mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma regression after Helicobacter pylori eradication.** Laryngoscope. 2009 Aug; 119(8):1491-4.
- 19) Berthold Streubel, Daniela Huber, Stefan Wöhrer, Andreas Chott, Markus Raderer. **Frequency of Chromosomal Aberrations Involving MALT1 in Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma in Patients with Sjögren's Syndrome.** Clinical Cancer Research. Vol. 10, 476-480, January 15, 2004
- 20) Spee Leo, Madderom Marieke, Pijpers Maaïke, Van Leeuwen Yvonne, Berger Marjolein. **Association Between Helicobacter pylori and Gastrointestinal Symptoms in Children.** PEDIATRICS Volume 125, Number 3, March 2010.
- 21) Epplein Meira, Nomura Abraham, Hankin Jean, et al. **Association of Helicobacter pylori infection and diet on the risk of gastric cancer: a**



- case-control study in Hawaii.** *Cancer Causes Control.* 2008 October ; 19(8): 869–877. doi:10.1007/s10552-008-9149-2.
- 22) Lee Chung-Wei, Barry Rickman, Arlin B. Rogers, et al. **Combination of Sulindac and Antimicrobial Eradication of *Helicobacter pylori* Prevents Progression of Gastric Cancer in Hypergastrinemic INS-GAS Mice.** *Cancer Res* 2009;69:8166-8174. Published OnlineFirst October 13, 2009.
- 23) Medina Myriam, Medina Marcelo, Martin Graciela, Picón Santiago, Bancalari Adriana, Merino Luis-Antonio. **Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jan 1;15 (1):e38-42.
- 24) Eskandari Amir, Mahmoudpour Ali, Abolfaz Nader Abolfazli, Lafzi Ardeshir Lafzi. **Detection of *Helicobacter pylori* using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jan 1;15 (1):e28-31.
- 25) Suzuki Nao, Yoneda Masahiro, Naito Toru, Iwamoto Tomoyuki, Masuo Yousuke, Yamada Kazuhiko, Hisama Kazuhiro, Okada Ichizo, Hirofujii Takao. **Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis.** *Journal of Medical Microbiology* (2008), 57, 1553–1559
- 26) Islami Farhad, Kamangar Farin. ***Helicobacter pylori* and Esophageal Cancer Risk: A Meta-analysis.** *Cancer Prev Res* 2008;1:329-338. Published online October 6, 2008.
- 27) The *Helicobacter* and Cancer Collaborative Group. **Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts.** *Gut* 2001;49:347–353.
- 28) Rajendran R, Rajeev R, Anil S, Alasqah M, Rabi A. G. ***Helicobacter pylori* coinfection is a confounder, modulating mucosal inflammation in oral submucous fibrosis.** *IJDR* Year : 2009. Volume : 20 Issue : 2 Page : 206-211
- 29) Momtaz H., Souod N., Dabiri H., Sarshar M. **Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples.** *World J Gastroenterol* 2012 May 7; 18(17): 2105-2111.
- 30) Dayama A., Srivastava V., Shukla M., Singh R., Pandey M. ***Helicobacter pylori* and Oral Cancer: Possible Association in a Preliminary Case Control Study.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 12, 2011.



ANEXOS



CONSENTIMIENTO INFORMADO

La presente tiene el objeto de preguntarle si desea participar en un estudio de investigación clínica. Usted es quien decide si desea o no participar. Si decide participar, debe firmar este Consentimiento Informado por Escrito. Aunque decida participar, tiene la libertad de retirarse (abandonar el estudio) en cualquier momento sin indicar el motivo. Mediante la realización de este estudio, se le realizará un procedimiento que nos ayudará a conocer la existencia de *Helicobacter pylori* en saliva y placa dental. Además, podremos obtener información médica importante para ayudar a futuros pacientes.

Helicobacter pylori es una bacteria que vive en un medio con poca cantidad de oxígeno, con forma de espiral y móvil que se cree que es uno de los principales factores responsables de la gastritis, úlceras gastroduodenales y cáncer gástrico. Los estudios han identificado el microorganismo en la placa dental y saliva, que implican que la cavidad oral puede ser un reservorio para *H pylori* o como una posible vía de transmisión a otros sitios, por lo que considera como un reservorio extragástrico para *H pylori*, que puede conducir a la infección gástrica recurrente.

Su participación en este estudio no tendrá ningún costo para usted. Así como también hacemos de su conocimiento que no recibirá ningún tipo de pago por su participación en este estudio. Su participación en este estudio es confidencial, los datos relacionados con su participación serán compartidos únicamente con los comités de Ética e Investigación que monitorean el correcto desarrollo de este estudio. Los resultados pueden ser publicados en libros o revistas especializadas en ciencias de la salud con el objetivo de ser utilizadas con fines educativos, sin embargo usted estará completamente en el anonimato en estos reportes.



TEXTO DECLARATORIO DEL CONSENTIMIENTO-INFORMADO

He recibido información verbal sobre el estudio aquí mencionado y he leído la información por escrito respecto al mismo. Me han dado oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas al respecto.

Doy mi consentimiento para participar en el estudio y estoy consciente de que mi participación es totalmente voluntaria. Entiendo que puedo retirarme en cualquier momento sin que esto traiga alguna consecuencia negativa para mí. Al firmar esta forma de información y consentimiento, estoy de acuerdo en que mis datos personales, incluyendo los relacionados con mi salud física o mental pueden emplearse en este estudio.

Paciente

Nombre del paciente / Firma

Fecha de la firma

Dirección del paciente

Teléfono

Testigo

Nombre del testigo / Firma

Fecha de la firma

Parentesco con el paciente

Persona que condujo el consentimiento informado

Nombre de Médico / Firma

Fecha de la firma



CRONOGRAMA

| | 2010 | | | | 2011 | | | | 2012 | | | | 2013 | | | | |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Oct-Dic | Ene-Mzo | Abr-Jun | Jul-Sep | Oct-Dic |
| Selección del tema de investigación | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Planteamiento del problema | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Establecimiento de objetivos | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Definición de Hipótesis | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Marco Teorico | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Definición de la metodología | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recolección de resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Descripción de Resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Análisis Estadístico | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Discusión de Resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Conclusiones | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Informe Final | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación final | | | | | | | | | | | | | | | | | |