

**Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Postgrado de Biología Celular**



**Evaluación de la expresión de marcadores tumorales y de la
infección por Virus Papiloma Humano y Epstein-Barr en la
etiología del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y
Cuello.**

**Tesis Doctoral Presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela,
por la Licenciada Dayahindara A. Veitía Monsalve para optar al título de
Doctor en Ciencias, Mención Biología Celular**

Tutor: Dra. María Correnti

Caracas, 04 de Abril de 2018



Comisión de Estudios de Postgrado

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ACTA DE DEFENSA DE TESIS
DOCTORAL

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: Dayahindara Veitia Monsalve portadora de la cédula de identidad N° 15.911.268, bajo el título, **"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES TUMORALES Y DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO Y EPSTEIN-BARR EN LA ETIOLOGÍA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO"** a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Doctor en Ciencias Mención Biología Celular**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 04 de Abril de 2018 a las 11:00 am, para que la Lic. Dayahindara Veitia Monsalve lo defendiera en forma pública, lo que hizo en la sala Werner Jaffe del Instituto de Biología Experimental, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLA**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la Lic. Dayahindara Veitia Monsalve, que dicho trabajo se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa una nueva línea de investigación científica oncológica en el país, utilizando herramientas que a futuro pueden ser usadas en beneficio de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Para su desarrollo se emplearon técnicas de avanzada de biología molecular de aplicación clínica.

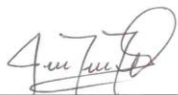


Handwritten signatures and dates:
Jueves 12/4/18

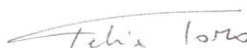


3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de EXCELENTE al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad representando una contribución al estudio de los factores de riesgo en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 04 días del mes de abril del año 2018. Conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuaron como miembros del jurado Dr. Francisco Arvelo (UCV); Dr. Felix Toro (IDI-UCV); Dra. Mariana Villarroel (UCV); Dra. Elizabeth Merentes (UCV).



Dr. Francisco Arvelo
C.I. 2.890.017
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



Dr. Felix Toro
C.I. 5.964.475
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



Dra. Mariana Villarroel,
C.I. 10.801.253
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Dra. Elizabeth Merentes,
C.I. 3.565.514
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Dra. Maria Correnti,
C.I. 6.1135.878
Universidad Central de Venezuela
Tutor



Resumen

El Cáncer de cabeza y cuello (CCC) agrupa a todas aquellas malignidades que se originan en el epitelio escamoso pluriestratificado de las líneas del tracto Aero digestivo superior, básicamente se dividen en 5 regiones básicas y éstas a su vez se dividen en sub regiones; siendo los tumores de la cavidad oral, laringe y orofaringe los más frecuentes. Representan el 7% de todas las neoplasias con predominancia en países de Europa y Asia, sin embargo se existen datos en Venezuela en los que se indican que son responsables del 2,8% de todos los decesos a nivel nacional. Dentro de los factores de riesgo asociados al desarrollo de los CCC se encuentran el consumo de alcohol y tabaco y recientemente se han descrito que las infecciones con virus oncogénicos como Virus Papiloma Humano (VPH) y Virus Epstein Barr (VEB) pueden ser factores importantes que se relacionan con la etiología de éstos. Se ha observado que en algunos casos estas infecciones virales pueden tener un impacto en la expresión de diversos marcadores moleculares, entre ellos P53, PCNA, Ki-67, Bcl-2 y EGFR, los cuales son la “huella digital” de un tumor y definen su viabilidad biológica. Es importante resaltar que a pesar de los tratamientos contra el cáncer desarrollado en las últimas décadas la sobrevida en el 55% de los pacientes con CCC no va más allá de cinco años; y a pesar de esto y de que se trata de malignidades de una rápida evolución, alta morbilidad y mortalidad son pocos los estudios realizados al respecto en nuestro país, por lo tanto nos hemos propuesto evaluar de la expresión de marcadores tumorales, de la infección por Virus Papiloma Humano y Epstein-Barr en la etiología del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello. Se evaluó un total de 80 muestras de pacientes con Carcinoma de células Escamosas de Cabeza y Cuello en el Hospital Oncológico Padre Machado. Se realizó la detección y tipificación de VPH mediante el estuche comercial INNO-LiPA *Genotyping Extra*, a aquellas muestras que resultaron positivas para VPH-16 se analizó la carga del gen E6 de VPH-16 y se evaluó el estatus físico del genoma viral mediante PCR en tiempo real. Igualmente se realizó la detección de VEB mediante una PCR anidada y se evaluó la expresión de los diversos marcadores moleculares mediante inmunohistoquímica. El promedio de edad de los pacientes fue de 60 años con predominancia del género masculino con hábitos tabáquicos y alcohólicos. El 51% de las muestras presentó infección por VEB y 66% infección por VPH, siendo el VPH-16 la infección más frecuente ya sea en forma de infección única o con otros genotipos. La orofaringe fue la localización anatómica que presentó una mayor carga de VPH-16 y un estado episomal, mientras que la cavidad oral y la laringe presentaron bajo número de copias y un estado integrado al genoma de la célula hospedera. Se observó una elevada proporción de co-infección VPH/VEB en cavidad oral y laringe lo que se relacionó con alteraciones en la expresión de Bcl-2, P53 y Ki-67; esto se ve reflejado en un alto índice de proliferación, disminución de la apoptosis y descontrol en la proliferación celular lo que conlleva a una elevada persistencia, alta mortalidad y mal pronóstico.

Palabras Clave: Cáncer, Cabeza y Cuello, VPH, VEB, P53, PCNA, Bcl-2, Ki-67,EGFR

***A mis padres por su amor infinito, por haberme dado la vida
y por haberme enseñado a vivirla. No hay manera de
devolverles tanto. Ha sido un privilegio ser su hija...***

Agradecimientos

Agradezco inicialmente a la vida, por todo lo que me ha dado y por todo lo que aún no.

Agradezco a mis padres y a mi abuela Magaly por haberme inculcado grandes valores, por todas sus enseñanzas, por su excelente manera de instruirme para afrontar las verdades de la vida. No hay manera de que pueda devolverles lo que me han ofrecido.

A mis hermanos Jean-Pierre y Williams, por ser parte importante de mi vida, por representar para mí la unidad familiar, por haberme acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias. A mis primos y sobrinos, especialmente a mi pequeña Valery, ella sin saberlo ha llenado mi vida de alegrías y amor incondicional cuando más lo he necesitado, porque simplemente mirando su carita y con sus besitos hace que olvide cualquier complicación, gracias por ser tan hermosa.

Agradezco a la UCV, a mi querida universidad, la casa que vence las sombras, por aceptarme nuevamente como parte de ella y abrirme las puertas de su seno científico, así como a los diferentes profesionales que brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco sinceramente a mi tutora, Dra. María Correnti gracias por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos y orientaciones; su persistencia, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Me ha inculcado sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no habría podido tener una

formación completa. Ha sido capaz de generar en mi lealtad y admiración, así como un sentimiento de deuda por todo lo recibido durante todo este tiempo.

Igualmente agradezco a mis compañeras de laboratorio Maira Ávila, Zoraya De Guglielmo e Yrneh Prado, cada una a su manera ha sido un gran apoyo para mí, tanto en lo académico como en la vida diaria, gracias por su comprensión y cariño durante todos estos años, por no dejarme sola y sobre todo por su amistad. Sin ustedes todo habría sido más complicado.

Agradezco infinitamente al Dr. Juan Liuzzi, del Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital Oncológico Padre Machado, por su dedicación y confianza así como por el aporte del material biológico empleado para realzar esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elizabeth Albornoz y a la OD. Elena Mujica del Postgrado de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la UCV, por toda su colaboración y especialmente por ayudarnos en la recolección de las muestras de los pacientes empleados como controles en esta investigación.

Agradezco al Dr. Felix Toro y a la Lic. Idamelis Rodríguez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Inmunología de la UCV, por todo su apoyo, colaboración y dedicación en el procesamiento de las muestras para la cuantificación y análisis del estatus viral.

Agradecimiento a la Dra. Antonieta Rennola por su colaboración en la interpretación de los resultados de los Marcadores tumorales y análisis de los mismos.

Agradezco especialmente a la Lic. Gisell Plata por toda su colaboración en el análisis de resultados y procesamiento estadístico de los datos.

Familia y amigos especiales de mi vida, no puedo separarlos porque para mí son un conjunto de seres queridos de importancia inimaginable. No podría sentirme más agradecida con la confianza puesta sobre mí, especialmente cuando he contado con su apoyo desde que siquiera tengo memoria. Este nuevo logro es en gran parte de ustedes, he concluido con éxito un proyecto más, que pareciera en un principio ser una tarea titánica e interminable. Quisiera darles mi agradecimiento más profundo, personas de bien, seres que ofrecen amor y bienestar.

Muchas gracias a todos aquellos seres queridos que siempre guardo en mi corazón y en mis pensamientos...

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
CCC	Cáncer de cabeza y cuello
CCECC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
VPH	Virus de Papiloma Humano
VEB	Virus ERpstein-Barr
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehido deshidrogenasa
Gen E	Genes de expresión temprana (ingles Early)
Gen L	Genes de expresión tardía (Ingles late)
EBNA	Epstein Barr nuclear antigens (antígeno nuclear de Epstein Barr)
LMP	Latent Menbrane Protein (proteína latente de la membrana)
EA	Early Antígens (antígeno temprano)
EAd	Early Antiges difuse (Antígeno nuclear de expresión difusa)
EAr	Early Antigens restringtec (Antígeno nuclear de expresión restringida)
VCA	Viral capsid antigens (Antígenos de la cápside viral)
EGFR	Epidermal Grow Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitogeno
STAT3	Activación de la transcripción 3
EGF	Epidermal Grow Factor (Factor de crecimiento epidérmico)
TGF	Transforming grow factor
TK	Tirosine kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase (proteínas quinasa activadas por mitogenos)
Shr2	Src Homology 2
Shr3	Src Homology 3
P53	Proteína P53
TSP1	Trombospondina 1
PRb	Proteína de retinoblastoma
Bcl-2	B-cell Lynphoma 2
BH2	Bcl-2 homology domain 3
Apaf 1	Apoptosis protease-activating factor-1
PCNA	Proliferating celular nuclear antigen
DNAc	ADN complementario
PRR	Reparación postréplica
IR	Radiación ionizante
AEC	Amino etil Carbazole
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	PCR en tiempo real Cuantitativa

Índice general

Contenido	Página
Introducción	13
Generalidades del Cáncer de Cabeza y Cuello	14
Clasificación TNM y estadiaje del CCC	15
Etiología del Cáncer de Cabeza y Cuello	17
Consumo de Tabaco	18
Consumo de Alcohol	19
Factores Ocupacionales	20
Factor Hormonal	21
Factor Inmunológico	21
Masticar Nuez de Betel	21
Infecciones Virales	22
Virus de Papiloma Humano	22
Genoma del Virus de Papiloma Humano	24
Mecanismos de Infección	27
Clasificación del Virus de Papiloma Humano	30
Frecuencias de Infección del Virus de Papiloma Humano	31
Carcinogénesis por Virus Papiloma Humano	32
Virus de Epstein-Barr (VEB)	36
Genoma de VEB	36
Genes latentes de VEB	37
Infección primaria y latente del VEB	40
Aspectos patogénicos de VEB	42
Mecanismos patogénicos del VEB	43
Marcadores Moleculares	45
<u>Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)</u>	45
Dominios de EGFR	46
Ligandos del EGFR	46
Unión ligando receptor	47
Ruta des señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	48
(EGFR)	
EGFR y carcinogénesis	51
<u>Proteína P53</u>	53
Dominios de P53	53
P53 y carcinogénesis	54
<u>B-Cell Lymphoma Two (Bcl-2)</u>	59
Sub-familias de Bcl-2	60
Mecanismos de acción	61
<u>Ki-67</u>	64
<u>Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)</u>	65

Antecedentes	66
Justificación	79
Objetivos	80
Materiales y Métodos	81
<i>Material Biológico</i>	81
<i>Plan de toma de muestras</i>	82
<i>Ensayos de Biología Molecular</i>	83
Extracción del material genético	83
Detección y tipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH)	84
Cuantificación y evaluación del estatus físico de VPH-16	86
Detección del Virus de Epstein-Barr	88
<i>Ensayos Inmunohistoquímicos</i>	89
Soluciones Buffers	89
Anticuerpos primarios	90
Descripción de la técnica	90
Montaje de las láminas	91
<i>Análisis Estadísticos</i>	92
Resultados	93
Discusión	166
Conclusiones	185
Anexos	187
Referencias Bibliográficas	200

Índice de tablas

	Página
Tabla 1.- Localizaciones anatómicas de los tumores de Cabeza y Cuello	15
Tabla 2.- Clasificación TNM según a Unión Internacional del Cáncer y la American Joint Comité of Cancer	16
Tabla 3.- Estadios del Cáncer de Cabeza y Cuello según la Unión Internacional del Cáncer y la American Joint Comité of Cancer	16
Tabla 4.- Genes del Virus de Epstein-Barr	42
Tabla 5.- Patogenia de Virus de Epstein-Barr	43
Tabla 6.- Secuencias de los iniciadores empleados para la qRT-PCR	87
Tabla 7.- Iniciadores para la detección del Virus de Epstein- Barr	89
Tabla 8.- Anticuerpos primarios y las concentraciones empleadas	90
Tabla 9.- Características generales de la muestra	93
Tabla 10.- Estadiaje TNM de la muestra en estudio	95
Tabla 11.- Detección y tipificación de VPH en pacientes con CCECC	97
Tabla 12.- Infección por VEB en pacientes con CCECC	101
Tabla 13.- Inmunopositividad para los marcadores moleculares	103
Tabla 14.- Relación entre los expresión de los marcadores moleculares con la persistencia de la enfermedad y el estatus de los pacientes	146
Tabla 15.- Parámetros clínicos, genotipos de VPH, carga viral y estatus físico de VPH-16 contenido en pacientes con CCECC	152

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.- Representación esquemática de la morfología del Virus Papiloma Humano	23
Figura 2.- Representación esquemática del genoma de VPH	25
Figura 3.- Mapa genético de la región larga de control del Virus Papiloma Humano	27
Figura 4.- Vías de entrada de VPH por endocitosis	28
Figura 5.- Representación esquemática de un epitelio infectado por VPH	30
Figura 6.- Diagrama de flujo de la patogénesis del carcinoma de Células Escamosas asociado a VPH de alto riesgo	35
Figura 7.- Forma latente del genoma del Virus Epstein-Barr	37
Figura 8.- Infección primaria y latente por Virus de Epstein-Barr	41
Figura 9.- Representación el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	46
Figura 10.- Formas de acción de los ligandos de los receptores ErbB	48
Figura 11.- Rutas de señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)	50
Figura 12.- Alteraciones de EGFR en las células tumorales	52
Figura 13.- Áreas de la proteína P53	53
Figura 14.- Modelos de regulación de la proteína P53	55
Figura 15.- Adquisición del fenotipo neoplásico a través de la exposición a oncogenes y del déficit funcional de genes supresores de tumores	57
Figura 16.- Esquema de apoptosis mediada por la familia Bcl-2	60
Figura 17.- Mecanismo de acción de la familia Bcl-2	63
Figura 18.- Positividad para la infección por VPH en pacientes con CCECC según la localización anatómica del tumor	99
Figura 19.- Positividad para la infección por VPH según el estadio tumoral	100
Figura 20.- Expresión de P53 en tumor de la cavidad oral	105
Figura 21.- Expresión de P53 en tumor de Orofaringe	106
Figura 22.- Expresión de P53 en tumor de Laringe	107
Figura 23.- Expresión de P53 en tumor de Seno Paranasal	108
Figura 24.- Expresión de P53 en CCECC según la localización anatómica del tumor	109
Figura 25.- Extensión le marcaje para P53 en pacientes con CCECC	110
Figura 26.- Intensidad del marcaje para P53 en pacientes con CCECC	111
Figura 27.- Positividad para P53 y su relación con la persistencia de la enfermedad	112
Figura 28.- Relación de la expresión de P53 y el estatus de los pacientes	113
Figura 29.- Expresión de Bcl-2 en tumor de Orofaringe	115
Figura 30.- Expresión de Bcl-2 en pacientes con CCECC según la localización anatómica del tumor	116
Figura 31.- Intensidad del marcaje para Bcl-2 en pacientes con CCECC	117
Figura 32.- Extensión del marcaje para Bcl-2 en pacientes con CCECC	118
Figura 33.- Relación entre la expresión de Bcl-2 y la persistencia de la enfermedad	119
Figura 34.- Relación entre la expresión de Bcl-2 y el estatus de los pacientes	120

Figura 35.- Expresión dePCNA en tumor de la Cavidad Oral	122
Figura 36.- Expresión dePCNA en tumor de Laringe	123
Figura 37.- Expresión dePCNA en tumor de Orofaringe	124
Figura 38.- Expresión dePCNA en pacientes con CCECC según la localización anatómica del tumor	125
Figura 39.- Extensión del marcaje para PCNA en pacientes con CCECC	126
Figura 40.- Intensidad del marcaje para PCNA en pacientes con CCECC	127
Figura 41.- Relación entre la Expresión dePCNA y la persistencia de la enfermedad	128
Figura 42.- Relación entre la Expresión dePCNA y el estatus de los pacientes	129
Figura 43.- Expresión deKi-67 en tumor de los senos paranasales	131
Figura 44.- Expresión deKi-67según la localización anatómica del tumor	132
Figura 45.- Intensidad del marcaje para Ki-67 en pacientes con CCECC	133
Figura 46.- Extensión del marcaje para Ki-67 en pacientes con CCECC	134
Figura 47.- Relación entre la expresión deKi-67 y la persistencia de la enfermedad	135
Figura 48.- Relación entre la expresión de Ki-67 y el estatus de los pacientes	136
Figura 49.- Expresión deEGFR en tumor de Orofaringe	138
Figura 50.- Expresión de EGFR en tumor de Laringe	139
Figura 51.- Expresión deEGFR en tumor de la Cavidad Oral	140
Figura 52.- Expresión deEGFR según la localización anatómica del tumor	141
Figura 53.- Intensidad del marcaje para EGFR en pacientes con CCECC	142
Figura 54.- Extensión del marcaje para EGFR en pacientes con CCECC	143
Figura 55.- Relación entre la expresión de EGFR y la persistencia de la enfermedad	144
Figura 56.- Relación entre la expresión de EGFR y el estatus de los pacientes	145
Figura 57.- Curva de amplificación para el gen E6 de VPH-16	148
Figura 58.- Curva de disociación para el gen E6 de VPH-16	149
Figura 59.- Electroforesis en gel de agarosa para la detección de E6 de VPH-16	150
Figura 60.- Curva de disociación para el gen E2 de VPH-16	151
Figura 61.- Curvas de sobrevida de los pacientes con CCECC	154
Figura 62.- Sobrevida asociada a la infección por VPH en pacientes con CCECC	156

Índice de esquemas

Esquema 1.- Esquema de recolección de las muestra	82
Esquema 2.- Infecciones virales y su relación con la expresión de marcadores moleculares en Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del Tumor.	157
Esquema 3.- Carga de E6 de VPH genotipo 16 en pacientes con Carcinoma de células Escamosas de Cabeza y Cuello	160
Esquema 4.- Relación de la integración del genoma de VPH-16 al genoma de la célula hospedera con la expresión de los marcadores moleculares	162
Esquema 5.- Propuesta de aplicación de la investigación en la práctica clínica	164

Introducción

El cáncer es un importante problema de salud en todo el mundo y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos; se origina por la proliferación descontrolada y la diseminación de clones de células transformadas, las cuales pueden producir metástasis en localizaciones distantes (Abbas y col. 2008).

Los carcinomas de cabeza y cuello (CCC) engloban una gran diversidad de neoplasias con diferencias en su incidencia, forma clínica de presentación, progresión de la enfermedad, enfoque terapéutico y pronóstico. Son tumores relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos se presentan en estadios avanzados de la enfermedad. La región de la cabeza y el cuello es extraordinariamente compleja, con una enorme variedad de entidades patológicas, cada una con aspectos etiológicos característicos, comportamientos biológicos, impactos funcionales y respuestas al tratamiento (Li y col. 2003; Fonseca E. 2005).

El CCC constituye en conjunto, la quinta neoplasia con mayor incidencia en la población mundial, pues se ha visto que afecta al 7% de todos los individuos diagnosticados con cáncer, siendo además la cuarta causa de muerte por cáncer en el varón. Su prevalencia estimada en el año 2002 fue de 1,6 millones de individuos, de los cuales aproximadamente las tres cuartas partes correspondieron a varones frente a un 27% de mujeres (Jernal y col. 2005). Cada año, hay un estimado de 45 000 nuevos CCC en los Estados Unidos; datos recientes alrededor del mundo indican que esta estadística es mucho mayor, especialmente en Europa, India y Hong Kong (Ringström y col. 2002). Una característica de estos tumores es su heterogeneidad, que no sólo es histológica, sino que comprende distintos aspectos epidemiológicos y etiológicos, diferentes formas clínicas de presentación y progresión, así como diversos enfoques terapéuticos y pronósticos (Arias y col. 2007). Se ha visto que a pesar

de avances en los tratamientos aplicados en las pasadas décadas el promedio de supervivencia es de cinco años con una tasa mantenida de ~55% debido a que únicamente un 30-35% de los pacientes con CCC se diagnostican en estadios precoces de la enfermedad (Ringström y col. 2002). Por otro lado, cada año se diagnostican 650 000 casos de CCC alrededor del mundo y mueren aproximadamente 350 000 a causa de esta malignidad (Badulescu y col. 2010).

La gran mayoría de CCC se presenta en varones, aunque hay una proyección a futuro que estima un aumento en el número de casos en el género femenino, debido fundamentalmente a la más reciente incorporación de las mujeres a prácticas de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco. En relación a la edad, se ha reportado que la incidencia de CCC es mayor a partir de los 50 años, aunque pueden verse a partir de la tercera década de la vida (Arias y col. 2007, Veitía y col. 2009; Veitía y col. 2014). El tipo más común es el carcinoma de células escamosas, el cual procede de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales (Arias y col. 2007).

Generalidades del Cáncer de Cabeza y cuello

El CCC se origina en el epitelio de revestimiento escamoso pluriestratificado de las líneas de tracto aéreo-digestivo superior y es característica su etiopatogenia multifactorial. Se ha descrito que estas malignidades se clasifican en cinco áreas básicas, cavidad oral, faringe, laringe, cavidad nasal y senos paranasales, y las glándulas salivales (Jemal y col. 2009).

Según Goñi (2006), los cánceres escamosos de cabeza y cuello se ubican en distintas regiones y subregiones del tracto aéreo-digestivo superior, y su clasificación se muestra en la tabla 1.

Tabla 1.- Localizaciones anatómicas de los tumores de cabeza y cuello

Cáncer de la Cavidad Oral	Cáncer Orofaringeo
Labio	Base de la lengua
Piso Oral	Región amigdalina
Lengua oral	Velo del Paladar
Mucosa yugal	Pared posterior de la faringe
Gingiva superior e inferior	
Paladar duro	
Trígono retromolar	
Cáncer Nasofaríngeo	Cáncer Hipofaríngeo
Una sola zona	Paredes faríngeas
	Senos piriformes
	Faringe postcricóidea
Cáncer de laringe	Cáncer de esófago cervical
Supraglótico	Una sola zona
Glótico o de las cuerdas vocales	
Subglóticos	
Cáncer del vestíbulo nasal, de la cavidad nasal y cavidades paranasales	

Clasificación TNM y Estadaje del CCC

El estadaje TNM propuesto por la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer), se basa en el diagnóstico de extensión de la enfermedad antes del tratamiento. Se obtienen mediante exploración física y pruebas de imagen, en ellos se estudia el tamaño de la lesión (T), la extensión a ganglios linfáticos (N) y la metástasis a distancia (M) (tabla2).

Tabla 2.- Clasificación TNM del CCC según Unión Internacional Contra el Cáncer y la American Joint Comitte on Cancer

T (tamaño del tumor primario)	N (Ganglios)	M (Metástasis)
TO = sin evidencia de tumor primario	NO = sin positividad clínica de ganglios	MO = sin metástasis conocida
Tis = carcinoma <i>in situ</i>	N1 = ganglio único homolateral <3 cm	M1 = metástasis a distancia presente
T1 = tumor primario <2 cm	N2a = ganglio único homolateral >3 cm y <6 cm	
T2 = tumor primario >2 cm ó <4 cm	N2b = ganglio homolaterales múltiples todos <6 cm	
T3 = tumor primario >4 cm	N3a = ganglio(s) homolateral(es), al menos 1 >6 cm	
T4 = tumor primario >4 cm con la invasión de estructuras profundas, piel o hueso cortical.	N3c = sólo ganglio contralaterales	

A partir de las clasificaciones anteriores, la combinación de los diferentes tamaños, positividad de los ganglios y metástasis se clasifican los tumores en estadios, lo cual se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.- Estadios del Cáncer de Cabeza y Cuello según la Unión Internacional contra el Cáncer y la American Joint Comitte on Cancer

EI	T1 N0 M0
EII	T2 N0 M0
EIII	T2 N0 M0; T1,2 Ó 3, N1,M0
EIV	T4, cualquier N,M0; cualquier T, N2 ó N3; M0; cualquier T, cualquier N, M1

Etiología del Cáncer de Cabeza y Cuello

La primera y más importante causa de cáncer de las vías aerodigestivas superiores es el hábito tabáquico. Se estima que entre 85 y 90% de los casos de cáncer de cabeza y cuello son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición; así los fumadores intensos tienen un riesgo superior respecto a los fumadores ocasionales. Desafortunadamente, se prevé un incremento en la incidencia de estas neoplasias, ya que desde hace algunos años se ha registrado un importante aumento en la frecuencia de tabaquismo, principalmente entre los individuos jóvenes y mujeres (Spitz y col. 1988).

El consumo de alcohol es otro de los factores más importantes asociado al cáncer en seres humanos, después del tabaquismo, las infecciones crónicas y posiblemente, la obesidad (Boffetto y Hashibe. 2006).

A pesar de la importancia en la carcinogénesis humana, la investigación de la relación entre el alcohol y el cáncer permanece limitada en aspectos clínicos, epidemiológicos y experimentales (Boffetto y Hashibe. 2006). La ingesta de alcohol tiene un efecto sinérgico con el tabaquismo. Un fumador que no bebe incrementa su riesgo en relación directa a la cantidad de tabaco que fuma. Un bebedor que no fuma incrementa su riesgo con relación a la cantidad de bebidas alcohólicas que ingiere; en cambio, beber y fumar tiene un efecto multiplicador más que aditivo (Blot y col. 1998). Por su parte, Herity (1981) reportó una asociación entre la cantidad de alcohol consumido y el riesgo para cáncer de lengua. Varias teorías de los mecanismos de esta relación invocan los efectos solventes del alcohol en las membranas mucosas, los efectos negativos en los procesos hepáticos de destoxificación y las deficiencias nutricionales comunes en los alcohólicos (Sloan y Goepfert. 1991).

Sin embargo, el cáncer en la nasofaringe no parece estar asociado al tabaco y al alcohol; en esta localización anatómica, el virus de Epstein-Barr (EBV) es detectado consistentemente con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la infección y sus efectos son un importante factor epidemiológico (Paredes 2004; Leiber y col. 1986). Fenómeno semejante ocurre en las fosas nasales y senos paranasales, donde se señala que la exposición a ciertos metales, como el aluminio, el níquel y el cromo; así como a cloro-fenoles y fibras orgánicas, propios de las industrias mobiliarias, textil y peletera, podrían tener un papel importante en la génesis de estos tumores (Battista y col. 1995; Pollan y López. 1995). Fuerte evidencia epidemiológica y molecular apoyan la conclusión de que el Virus de Papiloma Humano (VPH) es el responsable de la carcinogénesis en un grupo de pacientes con CCC. La infección sexualmente adquirida podría alterar la epidemiología y demografía del cáncer de las vías aerodigestivas. Actualmente, el diagnóstico de CCC positivo para VPH podría ser clínicamente relevante con fines de pronóstico y pudiera tener futuras implicaciones diagnósticas y terapéuticas, así como implicaciones en la prevención y escrutinio (Haigentz y col. 2005). Además, los virus del Herpes Simple (Parker y col.2006), factores nutricionales, higiene bucal y predisposición genética, también han sido señalados como factores de riesgo en el CCC (Rosenquist y col. 2005).

Factores que inciden sobre el desarrollo de CCC

Consumo de tabaco

Los fumadores de cigarros y pipas tienen un riesgo de 5-25 veces mayor de padecer algún tipo de CCC. Parece haber una relación directa con la dosis, la edad de inicio y el tiempo total de fumador. Además, los fumadores pasivos también presentan mayor riesgo de desarrollar CCC que los no expuestos al humo del tabaco (Spitz. 1988).

Entre los agentes cancerígenos del tabaco se encuentran la acroleína, la nicotina, el monóxido de carbono y, especialmente, hidrocarburos aromáticos presentes en el alquitrán, entre los que destaca por su poder cancerígeno el benzopireno. Otros hidrocarburos policíclicos con acción cancerígena demostrada son el dibenzopireno, dibenzoantraceno, benzofenantreno, dibenzoacridina y el dibenzocarbazol; el poder cancerígeno de cada uno de ellos es alto pero por separado es menor que cuando actúan conjuntamente en el humo del tabaco (Álvarez y col. 1995). El tabaco produce un aumento del grosor de la capa de queratina en las cuerdas vocales y una hiperplasia epitelial generalizada con metaplasma y edema e inflamación crónica de la submucosa (Martinez y col. 1992).

También se conoce que la guanina (G) es la base del ADN que sufre la mayoría de las mutaciones producidas por agentes químicos y que en los tumores relacionados con el tabaco es frecuente encontrar mutaciones del tipo transversiones de G por timina (T) y del tipo G por adenina (A) en el gen P53, las primeras se relacionan con el benzopireno mientras que las últimas con las nitrosaminas (Maestro y col. 1992). Igualmente, se ha relacionado a este hábito con una disminución en los niveles de folato en la mucosa bucal, el cual es un micronutriente que interviene en la síntesis de ADN y su ausencia parece aumentar la susceptibilidad a agentes mutagénicos (Spitz 1988).

Consumo de Alcohol

Aunque a menudo es difícil separar los efectos del tabaco con los del alcohol, numerosos estudios han demostrado consistentemente que el consumo de alcohol incrementa, independientemente al consumo de tabaco, el riesgo de padecer CCC.

Asimismo, el tabaco y el alcohol tienen efectos interactivos y multiplicativos (Blot y col.1998). El efecto del alcohol es dosis dependiente (Lewin y col. 1988). También existe

evidencia que la susceptibilidad genética juega un papel importante, en particular en los polimorfismos genéticos de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Druesne y col 2009).

Estudios demuestran que hay una mayor incidencia de CCC en personas que además de fumadoras son bebedoras. Esto es especialmente analizado para carcinoma supraglótico en el que la proporción de pacientes con antecedentes de ingesta alcohólica importante alcanza el 88% (Lowry. 1975). Se ha descrito que el principal metabolito del alcohol es el acetaldehído, y que este tiene una elevada capacidad de inhibir los mecanismos de reparación del ADN, lo que parece otorgarle un potencial carcinogénico al alcohol (Paredes .2004; Leiber y col. 1986). Independientemente de cual sea el mecanismo por el cual actúa el alcohol, es bien conocido que la gran mayoría de los pacientes con CCC son fumadores y bebedores, lo que sugiere que el alcohol puede jugar un papel irritante sobre la mucosa, favoreciendo la posterior acción carcinogénica del tabaco.

Factores ocupacionales

Muchas actividades laborales pueden implicar la exposición de sus trabajadores a carcinógenos, incrementando el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón y CCC. Entre ellos podemos nombrar la sílica cristalina y asbestos que son bien conocidos como carcinógenos humanos. Por otra parte los mineros de uranio y los trabajadores de plantas nucleares también poseen un altísimo riesgo de desarrollar la malignidad debido a su exposición a masas de partículas radioactivas (Boffeta 2004).

Efecto Hormonal

Como se mencionó, el CCC es mucho más frecuente en personas del sexo masculino (Veitía y col. 2009) lo que sugiere que pudiera haber un componente hormonal influyendo en estas estadísticas, aunque los estudios realizados al respecto no son concluyentes. Un trabajo realizado por Mattox y col. (1984) señala una posible relación entre estados que implica una androgenización con la aparición de cáncer de laringe, sin embargo, se han realizado estudios con terapia anti androgénica sin ningún resultado.

Factor Inmunológico

Se piensa que el sistema inmunitario actúa en el reconocimiento y eliminación de células neoplásicas y que el desarrollo de las mismas puede estar relacionado con una disminución de los mecanismos de defensa por defecto de la inmunidad celular o por fallo de la vigilancia inmunológica (Abbas y col. 2008). Se cree también que los pacientes inmunosuprimidos, como los pacientes transplantados o positivos para HIV, presentan una mayor frecuencia de determinados tipos de neoplasia. Por lo que respecta al factor inmunológico un grupo de autores ha señalado que ciertas alteraciones de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) de la clase I y II se relacionan con el comportamiento y pronóstico del cáncer de laringe (Esteban y col. 1990).

Masticar Nuez de Betel

La nuez de betel contiene sustancias químicas similares a la nicotina, pero 100 veces más fuertes lo que significa que el usuario experimenta un efecto mucho mayor; masticarla es un hábito muy común en algunas regiones de Asia, y se ha considerado como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de CCC y sus efectos son sinérgicos al del tabaco y el alcohol (Gourlat y col. 2012).

Infecciones Virales

Se ha determinado que algunos virus, tanto de ADN o ARN, poseen secuencias génicas que interactúan con el material genético de la célula huésped provocando la activación de los genes que intervienen en el control de la proliferación celular (Varmus y col. 1984). En este sentido, hay estudios que relacionan al virus Epstein-Barr (VEB) con el linfoma de Burkitt, el carcinoma de nasofaringe y con el carcinoma del timo, mientras que los papilomavirus se relacionan con el cáncer de cérvix, carcinoma de orofaringe y carcinoma de laringe (Lyeraz y col. 1985; Mc Cance y col. 1985).

Virus de Papiloma Humano

El Virus de Papiloma Humano (VPH) comprende a un grupo de virus pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, que infectan una gran variedad de vertebrados incluyendo al humano. Miden aproximadamente 50 nm, carecen de membrana y poseen una cápside con forma icosaédrica que está compuesta por 72 capsómeros (figura 1), cada capsómero es un pentámero conformado por la proteína principal L1, aunque también contiene la proteína L2 en menor cantidad. Actualmente se han identificado más de 100 tipos virales, de los cuales cerca de 40 son transmitidos sexualmente e infectan el aparato genital masculino y femenino (Cortés y col. 2001).

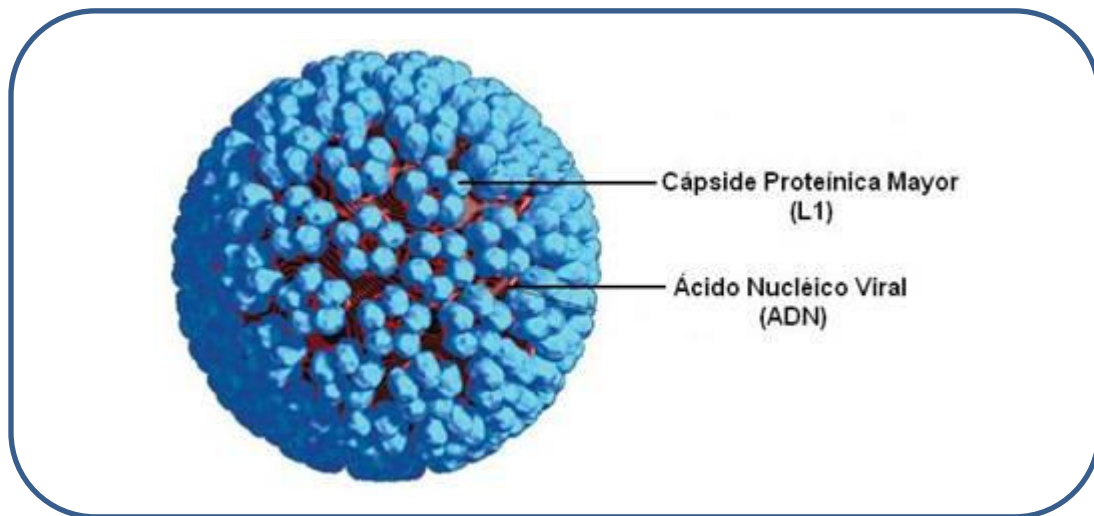


Figura 1.- Representación esquemática de la morfología del Virus de Papiloma Humano. Tomado y modificado de Cortés y col. 2001.

Estos virus producen infecciones en epitelios secos como la piel, originando lesiones como las verrugas cutáneas y también afectan las mucosas del tracto anogenital, el tracto respiratorio, incluyendo la boca y la garganta (Cortés y col. 2001).

Las lesiones anogenitales incluyen las verrugas genitales (condiloma acuminado, cresta de gallo), que son formaciones carnosas con aspecto de coliflor que aparecen en las zonas húmedas de los genitales. Este tipo de verrugas, por lo general, son causadas por los genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico (11 y 6), que también pueden producir verrugas en el cuello del útero, en la vagina, la uretra y el ano. En la boca y la garganta el VPH produce el papiloma oral y laríngeo, al igual que el papiloma de la conjuntiva en el ojo y el papiloma nasal (Graham 2010).

De esta manera, debido a su afinidad por el epitelio y mucosas y a su capacidad de transformar el genoma de la célula hospedera este virus se ha relacionado con varios tipos de

cáncer, entre los cuales se incluyen; cáncer cérvicouterino y cáncer de varios órganos tales como: amígdala, faringe, esófago, mama, próstata, ovario, uretra y piel (Graham 2010).

Genoma del Virus de Papiloma Humano

El genoma del VPH consiste en una molécula circular de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena (figura 2), que contiene aproximadamente 7.900 pb que se encuentra funcionalmente dividido en tres regiones: la primera es una región reguladora no codificante de 400 a 1.000 pb que se ha denominado región larga de control (LCR), o región reguladora superior. Esta región es la más variable de todo el genoma. La segunda región representa el 45% del genoma y consiste en marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) para las proteínas de expresión tardía no estructurales L1 y L2 (por sus siglas en inglés "Late") y proteínas no estructurales de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (de sus siglas en inglés "Early"), cuya función es controlar la replicación del ADN e inducir la transformación maligna de la célula hospedera (Cortés y Leal 2001; Burd 2003).

El gen **E1** controla la replicación episomal del ADN; si esta zona del genoma se encuentra completa y funcional se produce una replicación normal, evitando la integración del ADN viral al genoma de la célula. Se ha planteado que el gen **E2** codifica un factor represor de transcripción (E2-TR), el cual bloquea la transcripción de los genes **E6** y **E7**. La proteína E2 juega un papel muy importante en el ciclo de vida del virus ya que posee la capacidad de reprimir o activar los promotores virales. Aún no se conoce la función de la proteína **E3**. El gen **E4** produce proteínas que intervienen en la maduración de las partículas virales; esta secuencia genética se pierde cuando el ADN viral se integra al genoma de la célula. El gen **E5** produce una proteína pequeña de 44 aminoácidos, que se une a la membrana citoplasmática, la

pérdida o mutación de esta región, evita la replicación episomal del ADN y favorece su integración al cromosoma. Las regiones **E6** y **E7** (figura2), producen dos oncoproteínas transformantes, que suprimen la apoptosis y reactivan la síntesis de proteínas en el hospedador, facilitando así la replicación viral (Cortés y Leal 2001). Por último, la tercera región es la que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside del virus (Burd 2003).

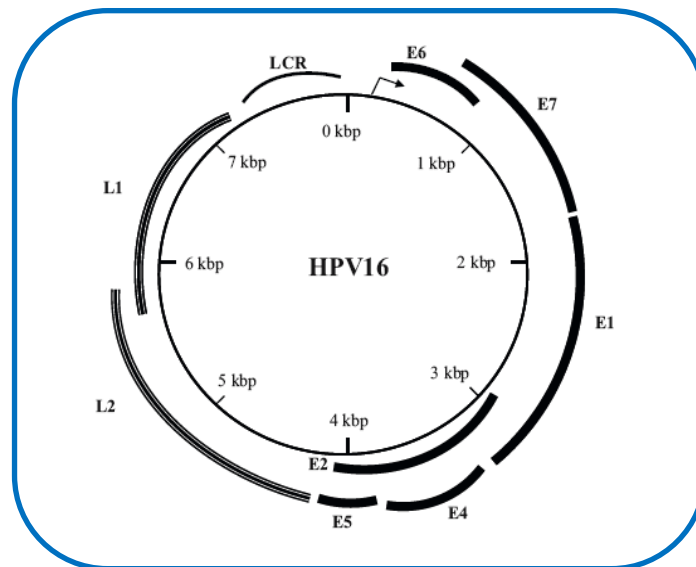


Figura 2.- Representación esquemática del genoma de VPH. Molécula de ADN, circular, doble cadena, de 7900 pb aproximadamente. Las líneas representan los 8 genes principales que codifican las proteínas virales. Los genes tempranos (E) y los genes tardíos (L). Tomado y modificado de Burns y Maitland. 2005).

La (RLC) Región Larga de Control, corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción como se observa en la figura 3. Ésta región se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, caracterizado por la presencia de la proteína viral E2, donde se localiza el origen de replicación del ADN viral, el promotor temprano; y el dominio CE (“celular enhancer” o potenciador celular), un

fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares (Cortés y Leal, 2001).

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes *E6* y *E7*. Posee una caja TATA funcional a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, y sitios de interacción de la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del ADN viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2. La especificidad tisular de los VPH reside en el Potenciador Celular (CE), donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. La región CE se compone de numerosos sitios de asociación específica de diversos factores de transcripción de origen celular, tales como AP-1, NF-1/CTF, Octa-1, TEF o F, entre otros. Además, se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción de VPH por un estímulo hormonal (Cortés y Leal, 2001).

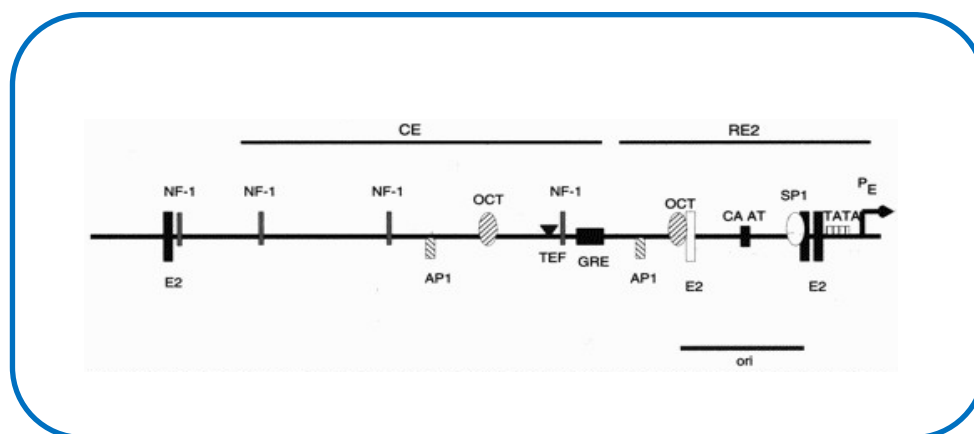


Figura 3. Mapa Genético de la Región Larga de Control (RLC) del Virus de Papiloma Humano (Cortés y Leal, 2001).

Mecanismos de Infección

De manera general, las fases involucradas en el mecanismo de infección de VPH y en la carcinogénesis son las siguientes:

- Unión e incorporación del virus

El sitio inicial de infección se cree que es en las células basales o células primitivas del epitelio escamoso inmaduro, debido a la presencia de receptores específicos para el VPH en esta zona (Kurman 2002). Durante la actividad sexual, la aparición de microabrasiones en el epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, lleva a la exposición de las células basales en activa proliferación a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi terminal (Giroglou y col. 2001).

Una vez que el virus se ha unido a la superficie celular se produce su internalización al citoplasma de la célula hospedera mediante endocitosis. Varios sistemas han sido reconocidos; uno de ellos involucra un complejo proteico llamado Clatrina, utilizado por los tipos 16, 18 y 58 y otro denominado endocitosis por caveolas utiliza un grupo de proteínas, principalmente Caveolina, en el que participa el VPH 31 (figura 4), (Rivera y col. 2006).

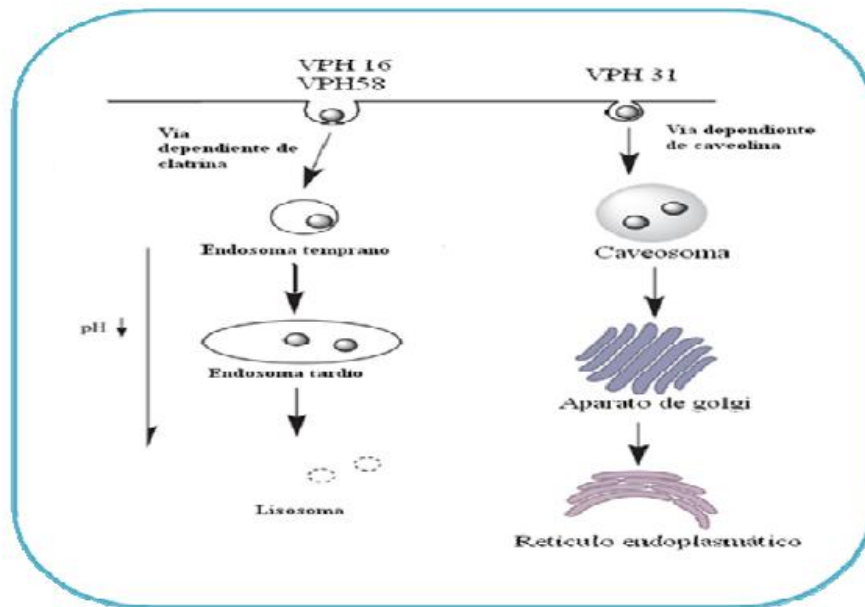


Figura 4. Vías de entrada del VPH por endocitosis. Los tipos de VPH 16 y 58 son capaces de ingresar al citoplasma por medio de una familia de proteínas llamadas clatrina, las cuales hacen posible la formación de endosomas tempranos, que posteriormente se convierten en endosomas tardíos en los que se comenzará la degradación a un pH entre 5 y 6 por la acción de enzimas lisosómicas. Al descender el pH, el genoma viral es liberado. El VPH tipo 31 ingresa a través de la vía dependiente de la proteína caveolina, la cual forma un caveosoma que se dirige a el Aparato de Golgi y luego al Retículo Endoplasmático (Tomado y modificado de Letian y col. 2010).

- Degradación de la cápside viral y transporte de material genético al núcleo celular.

Posterior a la endocitosis, existe evidencia en modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16, de que la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas

de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Rivera y col. 2006).

- Replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales

Una vez que el VPH ingresa en las células basales, este puede mantenerse en dos estados biológicos diferentes. Uno de estos estados es la infección no productiva o infección latente, en la cual el ADN viral reside en las células basales pero no se producen viriones infecciosos. En esta etapa un pequeño número de copias del genoma de VPH se encuentra en el núcleo bajo una forma extra cromosómica circular denominada forma episomal (Kurman 2002). Se ha postulado que durante esta etapa, se podría asegurar que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune (Ling y col. 2002).

La otra forma de infección por VPH es la denominada infección viral productiva, en la cual ocurre la replicación del ADN viral independientemente de la síntesis de ADN de la célula hospedadora. El ADN viral se localiza en las zonas intermedias y en la superficie del epitelio escamoso estratificado (Kurman 2002).

En este proceso de infección por VPH, a medida que las células basales se diferencian y se desplazan hacia la superficie del epitelio (figura 5), tienen lugar la replicación y la transcripción del ADN y se ensamblan las partículas virales en el núcleo. Los viriones completos son liberados por medio de los queratinocitos muertos (Mandell y col. 2006).

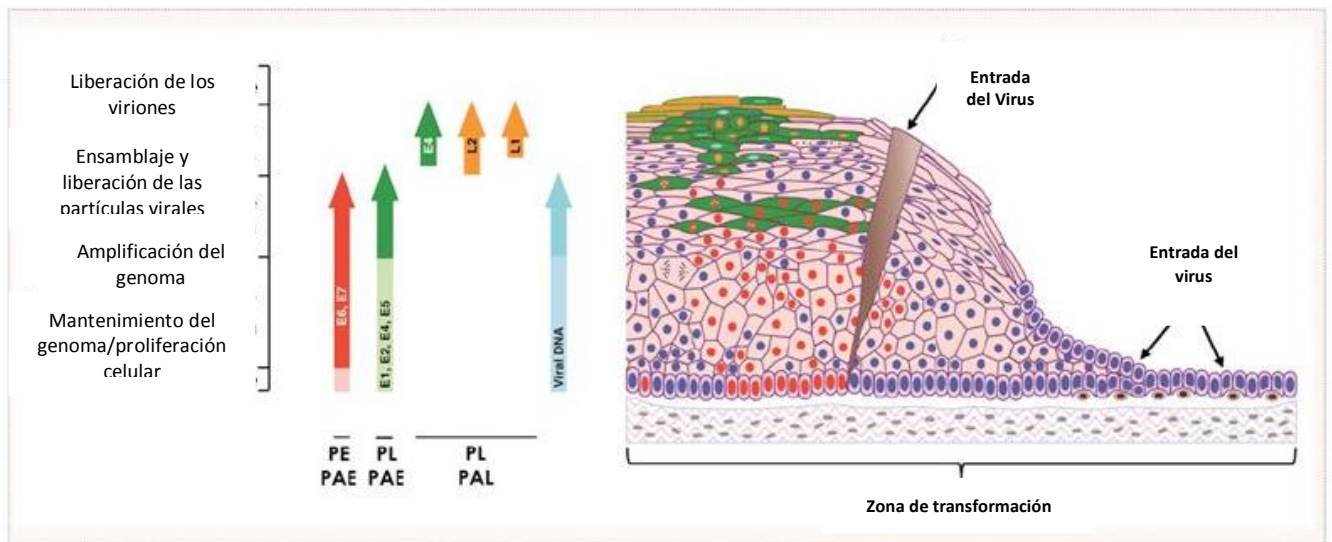


Figura 5. Representación esquemática de un epitelio infectado por VPH mostrando varias capas diferenciadas. Una microabrasión permite la entrada del virus. La amplificación del genoma, la expresión de genes tardíos y la producción de los viriones ocurre en las capas suprabasales (Tomado y modificado de: Diestro y col., 2007).

Clasificación del Virus de Papiloma Humano

Los papilomavirus, han sido categorizados en genotipos de alto y bajo riesgo de acuerdo a la capacidad que poseen de causar carcinoma de células escamosas en la cérvix uterina (Liviú y col. 2010).

VPH de Bajo Riesgo: Se les llama así a aquellos genotipos virales cuyo riesgo de provocar cáncer es bajo, siendo los más importantes los tipos 6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57. Los que provocan verrugas genitales, condilomas acuminados y cresta de gallo. Estos virus pueden causar cambios leves en el cuello del útero de la mujer los cuales no conducen al cáncer. No son perjudiciales y desaparecen con el tiempo (Stiben y col. 2007).

VPH de Alto Riesgo: Son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados en cáncer, e incluyen los VPH tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52 y 56. Siendo los genotipos 16 y

18 los que se encuentran con más frecuencia vinculados al cáncer de cuello uterino, anal y de la cavidad bucal. Por lo general la infección con VPH de alto riesgo no causa problemas de salud ya que la mayoría de las lesiones se resuelven espontáneamente. Pero, en ocasiones, la infección por éste tipo de virus puede provocar cambios celulares que con el tiempo pueden conducir a cáncer, si no son tratados. Y en este sentido, aquellas infecciones con VPH de alto riesgo oncogénico persistentes (aquella que no desaparece durante años) incrementan la probabilidad de que lesiones benignas avancen a lesiones premalignas y que estas últimas progresen a cáncer *in situ* (Stiben y col. 2007).

Frecuencia de Infección por Virus de Papiloma Humano

En Venezuela, para el año 1996, se reportaron 3 826 casos de VPH entre hombres y mujeres. Si se calcula la relación porcentual con los 23 242 435 habitantes que existían en el país para ese año, según las cifras de la Oficina Central de Información y Estadística, aproximadamente un 0,016% de la población padecía del virus.

Las cifras de 1997 de la Organización de Bienestar Estudiantil de la Universidad Central de Venezuela cuyos datos son reportados por el Laboratorio de Genética Molecular ubicado en el Instituto de Oncología y Hematología de la Universidad Central de Venezuela, demuestran que en ese año, se detectó el virus a 141 estudiantes (10,7%) de un total de 1 312 universitarias que acudieron a este servicio, y para el período 1997-2007, la misma institución reportó 266 de 729 (36,5%) pacientes positivos de los pacientes que acudieron a la consulta.

Las cifras del Ministerio de Salud y Desarrollo Social para el año 1999 registraron 4 841 casos, de los cuales 2 410 (49,8%) representaban al género femenino, lo cual resulta alarmante en relación a la frecuencia de infección viral. Los ginecólogos entrevistados para este reportaje manifestaron que en sus consultas, el VPH es la causa primordial de las citas

médicas, o en su defecto, un mal bastante común entre pacientes jóvenes. Un estudio realizado por Correnti y colaboradores en el año 2002 reportaron la presencia de VPH en distintas zonas de Venezuela. Un hallazgo importante de este trabajo fue la detección del genotipo de mayor circulación en Latinoamérica: el VPH tipo 16, el cual es uno de mayor potencial oncogénico.

A escala mundial, el VPH es el responsable de un 5,2% de todos los tumores humanos, correspondiendo un 2,2% a los países desarrollados, y un 7,7% a los países en vías de desarrollo (Diestro y col. 2007).

Carcinogénesis por Virus de Papiloma Humano (VPH)

La carcinogénesis por los VPH genitales es muy compleja y depende en gran parte de factores de la célula hospedera. El virus en la fase temprana del ciclo produce las oncoproteínas E6 y E7 (Cortes y col. 2001). Cuando estas proteínas se expresan en células infectadas con VPH de bajo riesgo son capaces de activar proteínas que pueden inducir lesiones benignas, mientras que cuando son expresadas en células infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico, favorecen el rol de las oncoproteínas y tienen la capacidad de inducir displasias y lesiones epiteliales malignas (figura 6) (von Knebel 2002).

La oncoproteína E6 de VPH de alto riesgo presenta como actividad característica la degradación del gen supresor de tumores *P53*, cuyas funciones incluyen control de la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (Miller 2005). Está bien descrito que la inactivación, degradación o mutaciones en el gen *P53* puede desregular sus funciones resultando en un incremento de la proliferación celular, acumulación de ADN dañado, crecimiento de células con acumulación de daños y en células con una sobrevivencia prolongada (Naghiem 1998).

También se conoce que E6 puede mediar la proliferación de células a través de uniones a dominios PDZ, lo que puede resultar en la degradación de dichos dominios llevando a la desregulación en la organización, en la diferenciación celular y en la integridad cromosomal, lo que contribuye con la transformación morfológica de las células infectadas con VPH de alto riesgo oncogénico (von Knebe 2002).

Por su parte, la oncoproteína E7 de los Virus de Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico tiene la capacidad de iniciar la síntesis de ADN en células epiteliales mínimamente diferenciadas por unión e inactivación del gen de retinoblastoma (*pRb*), gen de apoptosis/supresor de tumores. La familia de proteínas de retinoblastoma (Rb) juega un papel esencial en el control del ciclo celular por ser un punto de control entre la fase G1 y S. En condiciones normales las proteínas Rb hipo fosforiladas se unen al factor de transcripción E2F formando el complejo Rb-E2F, secuestrando a este factor haciéndolo inaccesible para la transcripción de genes asociados con la síntesis de ADN; en condiciones de hiper fosforilación de Rb por el complejo ciclina CDK, se libera el factor E2F y se induce la transcripción de los genes en fase S (Doorbar 2005; von Knebel 2002).

De esta manera, la oncoproteína E7 inactiva funcionalmente a la familia de proteínas de RB resultando en sobreexpresión del factor de transcripción E2F, lo que lleva a la replicación del ADN y a la transición de la célula desde la fase G1 a S y al incremento de la proliferación celular. E7 también puede inactivar otros factores de control del ciclo celular incluyendo desacetilasas de las histonas inhibidores de CDK, p21 y p27 (Doorbar 2005), así como determinar una disminución en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) de la clase I, interfiriendo con la presentación antigénica y

disminuyendo la capacidad de la respuesta inmune de la célula, permitiendo la persistencia de VPH en las células epiteliales infectadas (Miller. 2005).

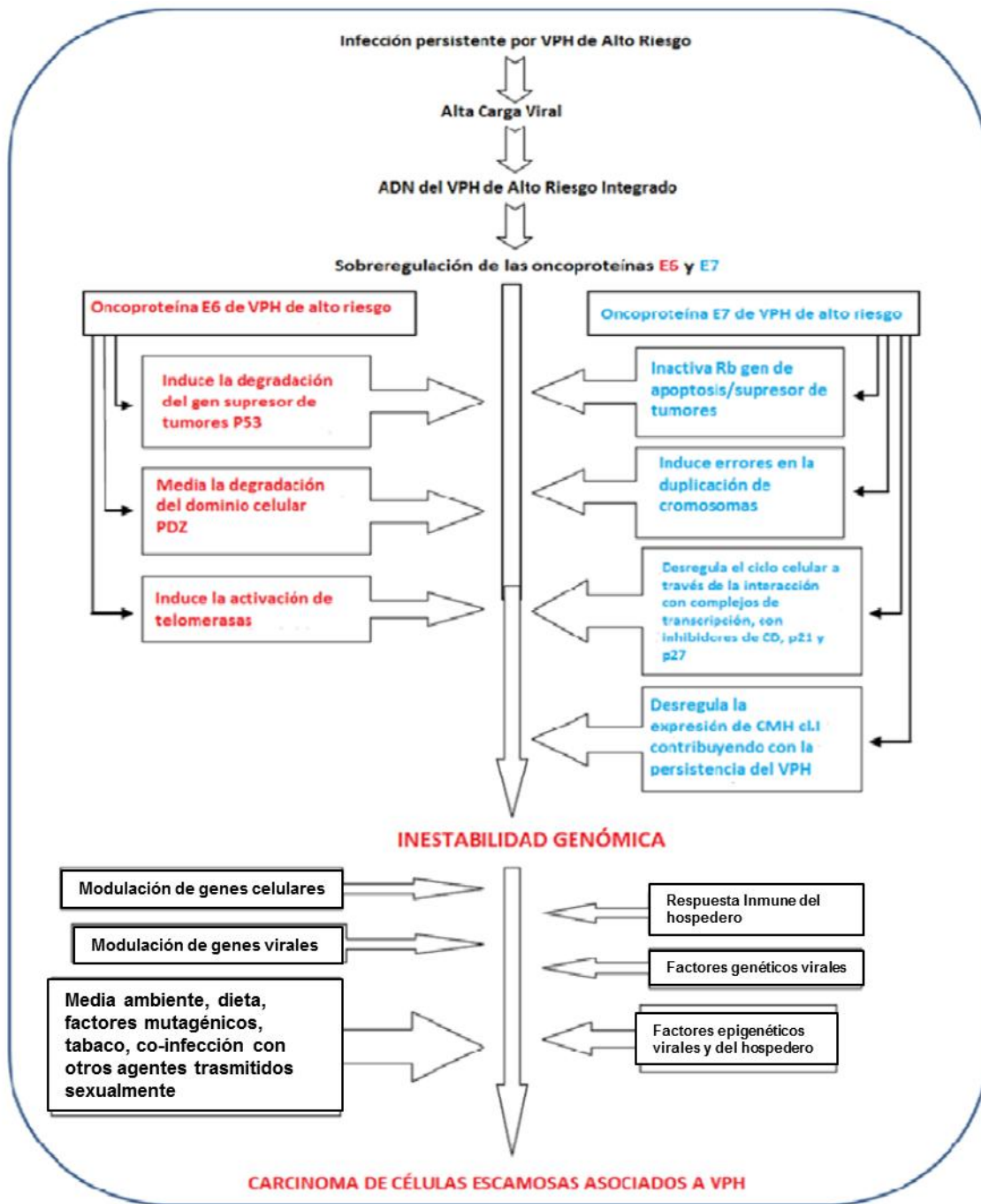


Figura 6. Diagrama de flujo de la patogénesis del carcinoma de células escamosas asociados a VPH de alto riesgo. Por inactivación de P53, la oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo induce sobrevivencia celular y retarda la apoptosis, y E7 a través de la inactivación de genes de Rb estimula la síntesis de ADN y crecimiento de células patológicas. Las actividades patológicas de E6 y E7 de VPH se complementan en el ciclo celular y median la transformación de células epiteliales. Tomado y modificado de Liviu y col 2010.

Virus Epstein-Barr

El virus Epstein-Barr (VEB) pertenece a la familia de los herpesvirus (que también incluye al Virus del Herpes Simple y Citomegalovirus). Se descubrió en células cultivadas de linfoma de Burkitt. En 1968, se estableció como un agente etiológico de la mononucleosis infecciosa y en los 70's fue detectado en tejido de pacientes con carcinoma nasofaríngeo. Posteriormente en los años 80's se le relacionó con linfoma no Hodgkin en pacientes con VIH-SIDA (Cohen 2000).

Genoma del Virus de Epstein-Barr

El genoma de este virus está constituido por una molécula de ADN doble cadena de una longitud aproximada de 172 kb que codifica unas 100 proteínas. La molécula de ADN está flanqueada en ambos extremos por un número variable de repeticiones terminales, cada una de ellas de una longitud aproximada de 500 pb. La recombinación entre estas repeticiones terminales origina la formación de una molécula extracromosómica cerrada covalentemente o episoma, que es la estructura de forma latente que adopta el virus en el núcleo de las células infectadas. El número de repeticiones que queda en cada episoma tras la unión de los extremos se utiliza como marcador de clonalidad (Bellas y col 2004) (figura 7).

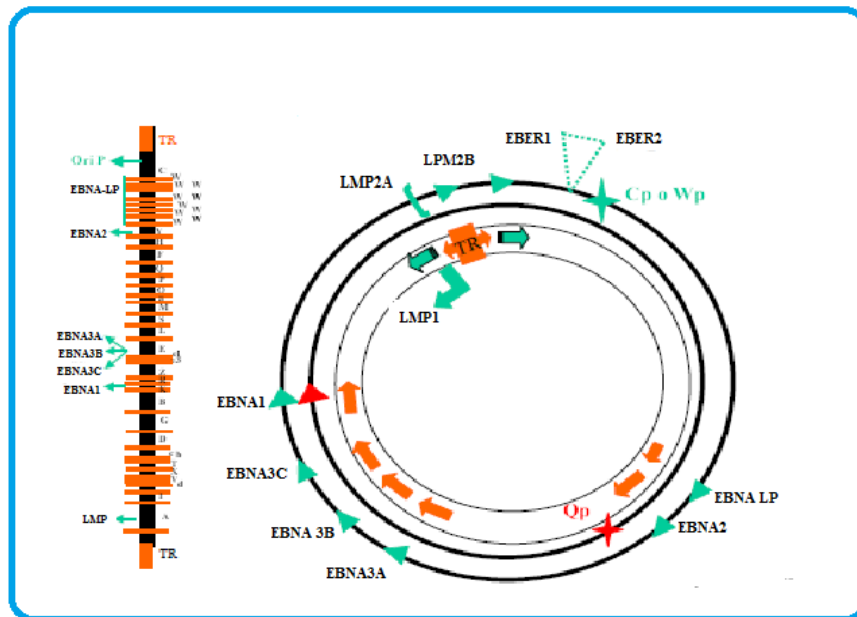


Figura 7.- Forma latente del genoma del Virus Epstein-Barr. Tomado y Modificado de Beltramino y col. 2005

Genes latentes del VEB

1. ARN codificados por el VEB (EBERs)

Los *EBERs 1* y *2* son pequeños ARNs no poliadenilados que están presentes en un número estimado de 10^5 a 10^6 copias por célula (Ralf Kupper. 2003). Son ARNs no codificantes, de 167 y 172 nucleótidos respectivamente. Ambos se expresan en todas las formas de latencia (Rowe. 1999). Se unen a la proteína quinasa (PK) activada del ARN de doble cadena inducida por interferón (IFN) inhibiéndola (Takada y Nambo. 2001). Esta proteína quinasa es un mediador crucial de la acción del IFN, su unión a los *EBERs* inhibe su actividad suprimiendo los efectos antivirales del IFN (Ralf. Kupper 2003). También se ha sugerido que *EBER 1* y *2* tendrían un papel en el corte y emplame (splicing) de otros transcritos virales como EBNAs y LMPs, previniendo la apoptosis y estimulando la producción de interleucinas (IL) (Middeldorpp y col. 2003),

sin embargo el papel de los *EBERs* en la transformación celular por VEB es aún incierta (Thompson. 2004) .

2. Antígenos nucleares del VEB (EBNAs)

Se conocen hasta ahora los antígenos nucleares de VEB, EBNA 1, EBNA 2, EBNA 3 y EBNA LP. EBNA 1, es una fosfoproteína de unión al ADN de secuencia específica, necesaria para la replicación y el mantenimiento del genoma del VEB (Middelton. 1994). También tendría un papel central en el mantenimiento de la infección latente por el VEB (Thomposon. 2004). Está formada por un dominio amino terminal, un segmento de secuencia Gly-Ala (glicina-alanina) repetidas, de longitud variable, otro dominio básico corto que incluye una secuencia de localización nuclear y un largo segmento carboxi- terminal hidrofóbico de unión al ADN y actividad de dimerización (Young. 2003) . El dímero de EBNA 1 se une al ADN mediante la interacción de una secuencia repetida, que está presente en tres sitios del genoma (Middekdropp y col. 2003). Luego de la unión de EBNA-1 al origen de replicación plásmica (Ori P), el VEB utiliza la maquinaria enzimática de la célula hospedera para completar la replicación (Ghan y col. 19889). Cuando EBNA 1 se une al Ori P del VEB episomal, se asocia también a los cromosomas de la célula hospedera durante la mitosis (Ambinder y col. 2003). Esto sería trascendente para permitir la replicación y persistencia de la forma episomal en las células en división y para la segregación de episomas en los núcleos de las células hijas (Ralf Kupper.2003). Se cree que EBNA 1 es la única proteína que se expresa en todas las células con infección latente (Sharon y col. 2001). EBNA 2, es la primera proteína viral que se expresa luego de la infección

por VEB en las células B in vitro, y es esencial para la transformación celular (Ralf Kupper. 2003). EBNA-2 es un coactivador transcripcional que coordina la expresión de los genes virales en la latencia tipo III y también transactiva numerosos genes celulares jugando un rol crítico en la immortalización celular (Ambinder y col. 1990). EBNA LP, es una de las primeras proteínas virales producidas durante la infección de las células B por VEB (Wensing y Farrell.2000). EBNA-LP es esencial para la transformación ya sea directa o indirectamente vía EBNA 2, estimulando la expresión de factores del hospedero necesarios para el crecimiento de las células B. Interactúa con EBNA-2 para conducir a los linfocitos B en reposo a la fase G1 del ciclo celular por medio de la unión e inactivación de P53 y los productos del gen supresor de tumor del retinoblastoma (Szekely y col. 1993). EBNA-LP se une a la P53, proteína Rb (retinoblastoma) y a proteínas quinasas C (PKs C), las cuales regulan la transcripción por vías específicas de fosforilación que simulan las vías de activación del receptor de células B (BCR). Este es un paso importante en los estadios tempranos de la transformación mediados por VEB (Middeldorpp y col. 2003). Mientras que EBNA 3 se comporta como regulador transcripcional.

3. Proteínas latentes de membrana (LMPs)

LMP 1, es una proteína integral de membrana con 6 segmentos hidrofóbicos y un tallo citoplasmático (extremo carboxi-terminal) que contiene la función efectora (Farrell.1988) y presenta características similares al CD40, un receptor de activación de las células B (Young. 2003). Está involucrada en la transformación celular dado que actúa como un receptor CD40 constitutivamente activado y mimetiza la señal de

crecimiento celular que normalmente resulta de la unión con el CD40 ligando (Middeldorpp y col. 2003). Se considera como el gen transformante más importante codificado por VEB, ya que se ha visto que aumenta la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, in vitro se ha asociado con la transformación de líneas celulares de fibroblastos y con el estímulo de la génesis de tumores, por su parte LMP 2 A y B: Son proteínas integrales de membrana que difieren en su dominio amino-terminal (Rowe. 1999). LMP 2 A y B, sólo se transcriben una vez que el episoma viral ha sido formado (Middeldorpp y col. 2003).

Infección primaria y latente por VEB

La infección se adquiere por transmisión oral; tras una fase inicial de multiplicación en las células de la orofaringe, se produce la infección de los linfocitos B y otros tejidos del sistema retículo endotelial (figura 8). Después de la primoinfección, el virus persiste en fase de latencia, habitualmente de por vida, en los linfocitos B, las células endoteliales de la orofaringe y, quizá también, en el cuello de útero. Se han descrito reactivaciones acompañadas de la replicación y producción de viriones que, sin embargo, no suelen acompañarse de manifestaciones clínicas (Mendoza y Rojas. On-line: <http://www.seimc.org>. Consultada en marzo de 2011).

Se conoce un gran número de proteínas codificadas por el genoma de VEB. Durante la fase de latencia viral se expresan diversos antígenos en las células infectadas, que incluyen seis proteínas del tipo EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigens*), las tres proteínas latentes de membrana (LMP) y el antígeno de membrana detectable en los linfocitos (LYDMA). Durante la fase lítica aparecen, además, los antígenos precoces "*early antigens*" (EA), bien bajo el

patrón de expresión celular difusa (EAd) o como restringidos (EAr), al igual que el antígeno de la cápside viral (VCA). (Mendoza y Rojas On-line: <http://www.seimc.org>. Consultada en marzo de 2010).

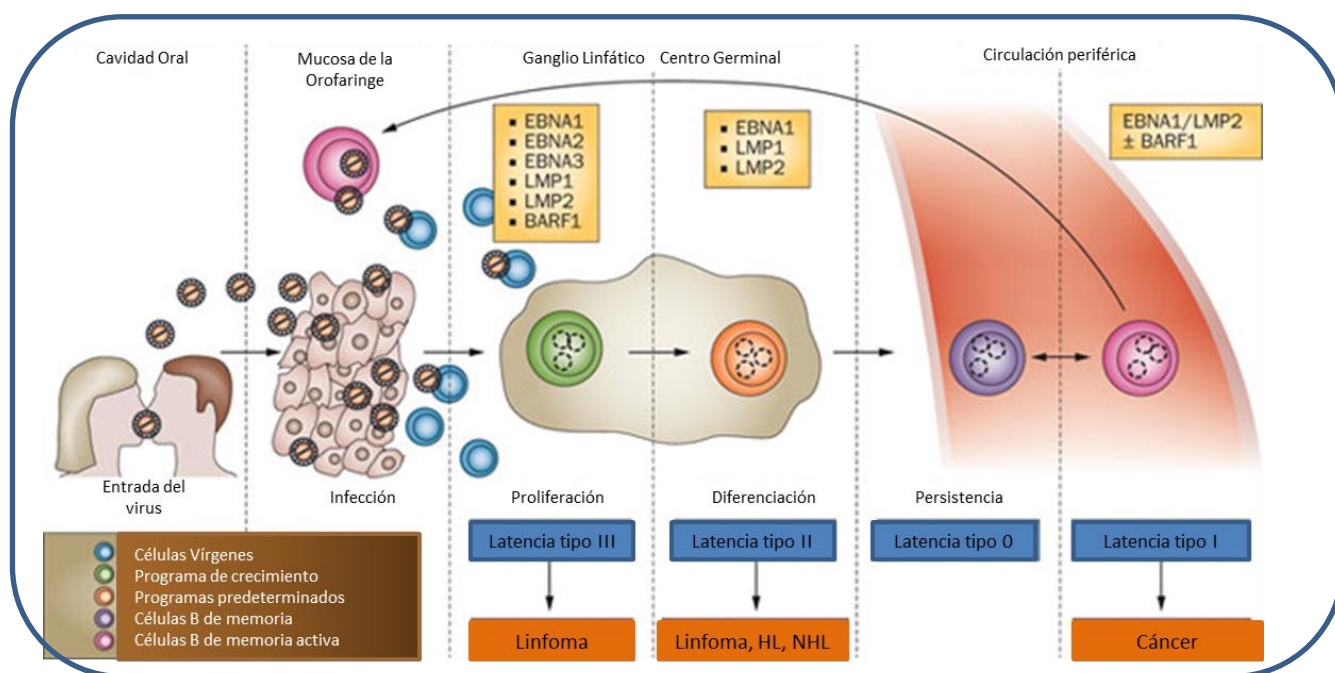


Figura 8.- Infección primaria y latente por virus de Epstein-Barr. Tomado y modificado de Mendoza y Rojas (2010)

Recientemente se está cuestionando este modelo en el que las células epiteliales de la orofaringe serían el foco primario y el reservorio de la infección por el VEB y en el que los linfocitos B se infectarían de forma secundaria. Trabajos recientes confirman la constante ausencia de VEB en las células epiteliales normales de los individuos inmunocompetentes y demuestran la existencia de infección latente y productiva exclusivamente en los linfocitos presentes en el epitelio bucal y nasofaríngeo, por lo que parece posible que el VEB infecte directamente a los linfocitos B, y no de forma secundaria a la infección replicativa de las

células epiteliales (Mendoza y Rojas, On-line: <http://www.seimc.org>. consultada en marzo de 2010).

Aspectos Patogénicos del Virus de Epstein-Barr (VEB)

Como en el ciclo lítico se produce la muerte de la célula infectada, los genes que se expresan exclusivamente en el mismo no parecen tener demasiada importancia en la tumorigénesis, con la excepción de los genes BHRF1 y BCRF1 que sí pudieran tener un papel en el desarrollo de tumores. Por el contrario, los genes que se expresan en la infección latente son de especial interés en la patogénesis de las neoplasias asociadas al VEB (tabla 4) (Lin y col 1997).

Los mecanismos patogénicos por los que el VEB es capaz de inducir la aparición de tumores se relacionan con las proteínas codificadas por algunos de los genes expresados en la infección latente. Dichos productos inducen diferentes efectos sobre la célula hospedera infectada (tablas 4 y 5) que facilitan el desarrollo de tumores (Lin y col. 1997).

Tabla 4. Genes del VEB cuyos productos pudieran estar implicados en la tumorigenesis. Tomada de Lin y col. 1997.

<u>Gen</u>	
<i>EBNA 1</i>	Factor transcripcional, esencial para el mantenimiento del VEB. Induce la expresión de RAG1 y RAG2 in vitro
<i>EBNA 2</i>	Factor transcripcional, esencial para la transactivación de LMP-1
<i>EBNA 3A</i>	Factores transcripcionales, que favorecen una potente respuesta inmune
<i>(3B, EC)</i>	
<i>EBNA LP</i>	Proteína que interfiere con la función normal de las proteínas <i>p53</i> y <i>pRb</i>
<i>LMP-1</i>	Única proteína del VEB con capacidad oncogénica demostrada, interacciona con factores asociados a la familia de los receptores

	del TNF (TRAF); causa sobreexpresión de la proteína <i>Bcl-2</i> , <i>A20</i> y de la IL-10
LMP 2 A/B	Proteína relacionada con la familia src de las tirosina quinasa, pudiendo controlar la actividad del ciclo lítico del VEB
EBER 1/2	Fragmentos de ARN no traducidos, que se expresan abundantemente y cuya función es inhibir efectos antivirales de INF.
BHRF 1	Proteína homóloga de <i>Bcl-2</i> , capaz de inhibir la apoptosis
BCRF 1	Proteína homóloga de la IL-10, capaz de estimular la proliferación celular B e inhibir la capacidad citotóxica de los linfocitos T (CTL)

Tabla 5. Patogenia del VEB. Tomada de Lin y col. 1997

Acción	Genes
Inhibición de apoptosis	BHRF 1 y LMP-1
Inducción de proliferación celular	LMP-1, EBNA-2, BCRF 1, EBNA-LP
Inducción de translocaciones	EBNA-1
Escape a la respuesta inmune	BCRF 1, mutantes delecionados de LMP-1

Mecanismos patogénicos del VEB

Son básicamente cuatro:

1. *El mantenimiento de las poblaciones celulares infectadas mediante la inhibición de la muerte celular por apoptosis* (Jiwa y col. 1995):

- BHRF1, debido a su homología con *Bcl-2* podría interferir en el balance entre *Bcl-2* y *Bax* y, por este mecanismo, inhibir la apoptosis.
- LMP-1, una de cuyas acciones consiste en aumentar los niveles de *Bcl-2* y así inhibir la apoptosis.

2. *La inducción de proliferación celular mediante las moléculas* (Lin y col. 1997):

- LMP-1, esencial para la transformación de los linfocitos B primarios.
- EBNA2, cuya actividad muy probablemente consiste en mediar la transactivación de LMP-1 y de otros genes celulares implicados en la proliferación.
- BCRF1, proteína análoga a la IL-10 humana que actuaría como un factor de crecimiento autocrino de células B.
- EBNA-LP, que puede formar complejos con P53 y Rb, y al secuestrar los productos de estos genes supresores de tumores, activaría la proliferación celular.

3. *La inducción de recombinasas que posibilitan translocaciones mediante la molécula* (Lin y col. 1997):

- EBNA-1, que induce la expresión de los genes RAG-1 y RAG-2, lo que podría favorecer la producción de recombinaciones aberrantes (translocaciones).

4. *La evasión de la respuesta inmune mediada por células T* (Kaye y col 2004):

- Las proteínas virales más antigénicas para los linfocitos T son: EBNA3A, 3B y 3C, pero los linfocitos T responden también frente a EBNA-2, EBNA-LP, LMP-1. Los métodos que utiliza el VEB para escapar a la respuesta inmune son:
 - Regular a las proteínas virales con mayor poder antigénico.
 - Inhibir a las células T mediante la secreción de algunas citocinas por las células infectadas como IL-10 y TGF.
 -

Marcadores Moleculares del CCC

En la actualidad los oncólogos cuentan con herramientas importantes que les sirven de apoyo en el pronóstico y evolución de este tipo de cáncer y además contribuyen a un mejor enfoque del tratamiento. Estas son sustancias producidas o inducidas por las células neoplásicas que reflejan el crecimiento y/o actividad de las mismas, conociéndose con el nombre de ***Marcadores de Pronóstico.***

Ciertas investigaciones, apoyan el hecho de que una excesiva proliferación celular ocasionada por cambios en genes supresores de tumores o proto-oncogenes conduce al desarrollo de cánceres humanos, y estos cambios genéticos están íntimamente relacionados con desarrollos neoplásicos por lo que pueden servir como marcadores para cambios específicos envueltos con la progresión del tumor (Bina y col. 2005); entre ellos tenemos: P53, PCNA, Bcl-2, Ki-67 y EGFR.

Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)

En vertebrados, el EGFR forma parte de la familia de receptores ErbB, la cual está constituida por otros tres receptores análogos identificados hasta la fecha, el ErbB2/HER2/Neu que tiene una masa molecular de 185 kDa, el ErbB3/HER3 y el ErbB4/HER4, ambos de 180 kDa (Alroy y Yarden. 1997). El dominio extracelular de estos receptores está bastante conservado, como ocurre con el dominio proteína quinasa, salvo en el caso de ErbB3 que no posee actividad catalítica, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores (Soltoff y col. 1994).

Dominios del EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico contiene dos dominios extracelulares denominados L, con un dominio extracelular similar a furina. Estos se encuentran conectados por la región transmembrana a un dominio intracelular que contiene el dominio quinasa catalítico con un sitio de fosforilación en tirosina (Y1068). Cuando esta región es fosforilada se activa la cascada del activador de la transcripción 3 (STAT 3), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la ruta de señalización AKT (Molina y col. 2008) (figura 9).

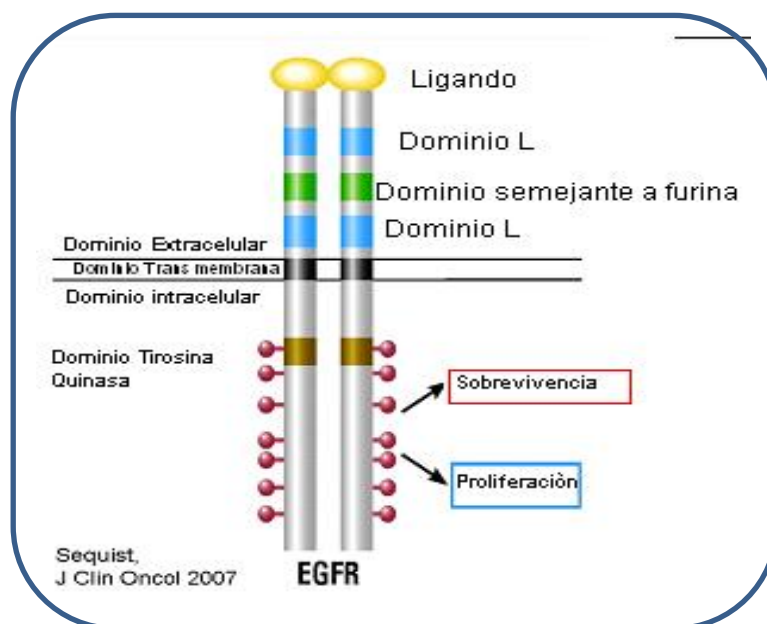


Figura 9.- Representación del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Tomado y modificado de Herbst y col. (2004).

Ligandos del EGFR

Existe un gran número de ligandos para los receptores ErbB que poseen el llamado módulo semejante a EGF (Epidermal Grow Factor). Así, aparte del propio EGF, se conocen a el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α , por *transforming growth factor- α*), la anfirregulina (AR), el factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HB-EGF, por

heparin-binding EGF-like growth factor), la b-celulina (BTC) y la epirregulina (EPR) (Carpenter y cohen 1979; Boonstra y col. 1995). Los diversos ligandos de la familia de receptores ErbB poseen diferentes afinidades de unión a los receptores y cada uno de ellos presenta un patrón de expresión distinto, lo cual contribuye en parte a explicar la pleiotropía funcional de estos receptores. Además, las diversas combinaciones posibles de homodímeros y heterodímeros que forman dichos receptores, generan una gran diversificación en la transmisión de señales. Esto es debido en parte a la aparición de baterías diferentes de residuos de tirosina transfosforilados en los receptores, los cuales son específicamente reconocidos por proteínas adaptadoras o transductoras con dominios SH2 (Scr homology domain 2) y/o dominios PTB (*Phosphotyrosine binding*) diferentes (Lowenstren y col. 1992, Alroy y Yarden. 1997).

Unión Ligando receptor

Los ligandos son sintetizados como precursores de alto peso molecular, los cuales se anclan a la membrana plasmática exponiendo sus dominios semejantes a EGF al medio; posteriormente son procesados proteolíticamente originando formas maduras y solubles del mismo, que son liberadas al medio extracelular. De esta manera son capaces de unirse a los receptores de la célula que los sintetizó o a células adyacentes produciendo activaciones autocrina o paracrina, respectivamente. Es importante resaltar que los precursores unidos a la membrana plasmática también pueden ser funcionales ya que en ciertos casos son capaces de unirse a receptores ErbB de células adyacentes, por lo que estarían implicados en señalización yuxtacrina (Massaguè 1990; Massagué y Pandiella. 1993) (figura 10)

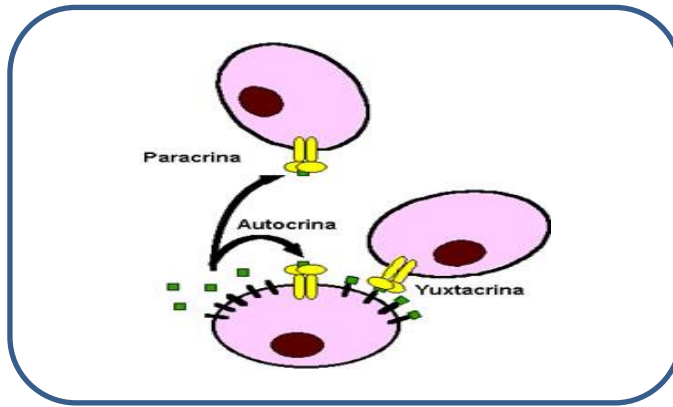


Figura 10. Diferentes formas de acción de los ligandos de receptores ErbB. Los precursores de los ligandos anclados a la membrana plasmática (cuadrados con segmentos) son procesados proteolíticamente generando ligandos maduros (cuadrados). Los ligandos maduros son capaces de interactuar con receptores ErbB (dímeros en forma de T) localizados en la misma célula (activación autocrina) o en células próximas (activación paracrina), mientras que los precursores unidos a la membrana plasmática pueden interactuar con receptores localizados en células adyacentes (activación yuxtacrina). Tomada de Massagué y Pandiella.1993

Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Cuando el ligando extracelular se une al EGFR se produce su dimerización, formando homodímeros o complejos heterodiméricos, con otro EGFR o con otro miembro de la familia HER. Esto causa una reorganización en la porción intracelular del receptor, lo que da lugar a la activación de su tirosina quinasa y la transfosforilación de los residuos de tirosina de su extremo C-terminal (Schlessinger. 1988). Los residuos de fosfotirosina del receptor activado son reconocidos por proteínas que poseen dominios SH2 (Heldi. 1991) o dominios PTB (van der Geer y Pawson. 1995). Estas proteínas pueden ser de dos tipos: proteínas adaptadoras que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien factores o enzimas transductores/as, que al unirse al receptor son fosforilados por este, pasando de un estado inactivo a activo. Por lo tanto, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras,

que transmiten sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales.

La ruta de señalización mejor conocida en diversos organismos e iniciada por el EGFR activado es la vía de las MAPKs (Cobb, 1999), la cual se inicia con la interacción del dominio SH2 de la proteína adaptadora con los residuos de fosfotirosina del receptor y de los dominios SH3 (Src homology domain 3), con los que interacciona con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, por “*guanine nucleotide exchange factors*”) tales como Sos1/2 (por *Son of sevenless 1 y 2*). Así, tras la formación del complejo Grb2/Sos, éste se trasloca a la membrana plasmática estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (forma activa) (Rozakis-Adcock y col. 1993) (figura 10). El Ras activo es capaz de interaccionar y activar a las serina/treonina quinasas Raf-1, A-Raf o B-Raf (o más genéricamente denominadas genéricamente MAPKKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinase kinases*) (Wood y col., 1992). Estas quinasas, a su vez, fosforilan a las tirosina/treonina quinasas duales MEK1/2 (del acrónimo *MAP/ERK kinases 1 y 2*, también denominadas MAPKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinases*), las cuales finalmente fosforilan a las serina/treonina quinasas ERK1/2 (por *extracellular-regulated kinases 1 y 2*, también denominadas MAPKs). Después de su activación, las ERK1/2 son activadas, y pueden fosforilar a diferentes proteínas dianas localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización o traslocarse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción como son, entre otros, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, produciendo así la activación o la represión transcripcional de determinados genes (Davis. 1993) (figura 11).

La activación de la vía Ras/MAPK parece ser imprescindible para la proliferación celular mediada por EGF, pero no parece ser esencial para la supervivencia celular, ya que este proceso está mediado por vías independientes de Ras (Walker y col. 1998).

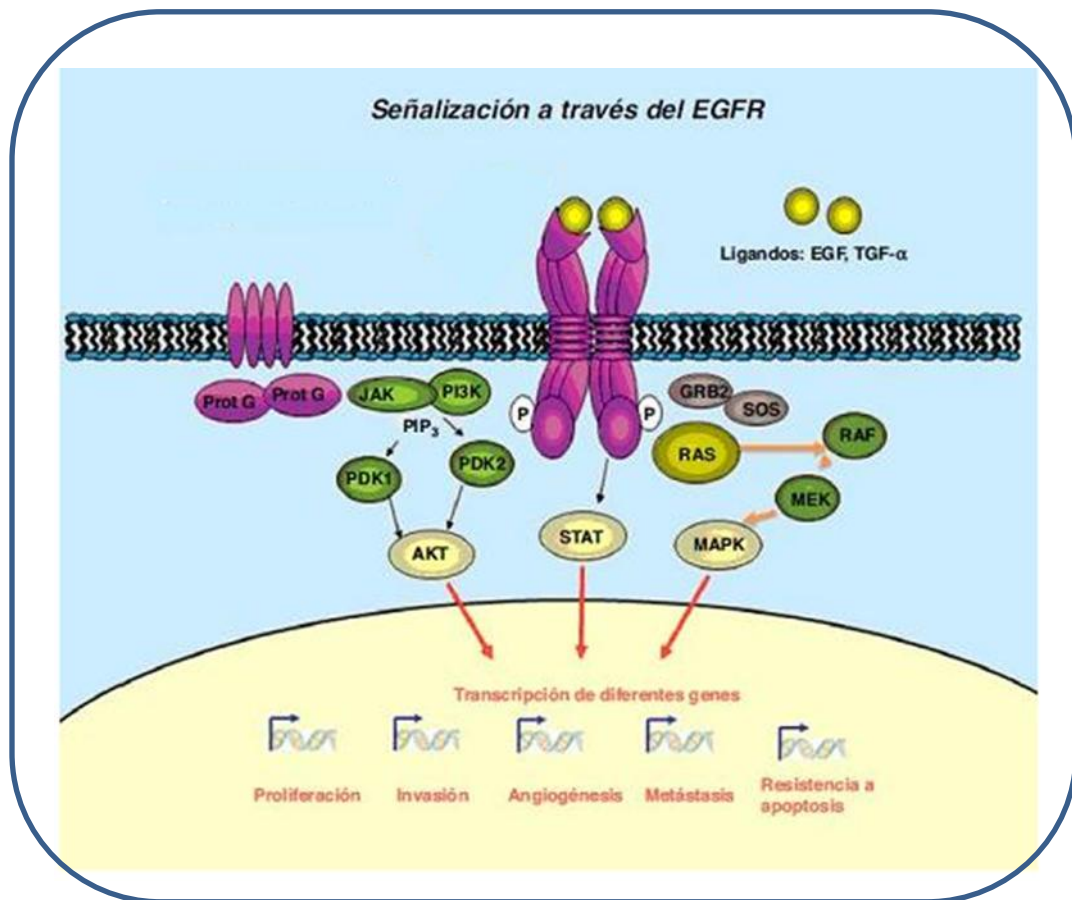


Figura 11.- Ruta de señalización de receptor del factor de crecimiento epidérmico. Tomado y modificado de Baselga y col. 2009

EGFR y carcinogénesis

La implicación del EGFR en la proliferación descontrolada de células tumorales se dedujo a partir de tres hechos:

1. El oncogén *v-erbB* de origen viral codifica una proteína truncada homóloga del EGFR que presenta una actividad tirosina quinasa exacerbada (Carpenter. 1987).
2. La sobreexpresión de EGFR en fibroblastos induce la aparición de un fenotipo transformado dependiente de la presencia del ligando (Di Fiore y col. 1987).
3. Es frecuente observar *in vitro* la sobreexpresión de EGFR en varios tipos de tumores humanos y líneas celulares tumorales (Merlino y col. 1984).

La presencia de un gran número de copias del EGFR en las células provoca una sensibilidad excesiva a sus ligandos, los cuales, aunque se encuentren en concentraciones muy bajas, son capaces de estimular la proliferación celular. La capacidad de endocitosis de las células es excedida por lo que el proceso de internalización es más lento, estas células no pueden reprimir adecuadamente la transmisión de señales mitogénicas que se generan de una forma continua (Cadena y Gill. 1992).

Así como se observa la sobreexpresión del EGFR en muchos tumores, en otros es frecuente observar la coexistencia del receptor normal con receptores aberrantes truncados. En la mayoría de los casos, los tumores presentan deleciones de exones que codifican parte del dominio extracelular del receptor. Por ejemplo, el EGFRvI es un receptor mutado similar al producto del oncogén *v-erbB1*, que está constitutivamente activado (Haley y col. 1989). Por otro lado, el receptor mutado EGFRvII tiene una deleción de 83 aminoácidos de su región extracelular. Este receptor mantiene la capacidad de unir el ligando pero presenta un aumento

de su actividad tirosina quinasa. Por el contrario, el receptor mutado EGFRvIII con una masa molecular de 140 kDa, carece de la región del dominio extracelular codificada por los exones 2-7 y no posee un sitio completo de unión al ligando. Esta mutación también provoca un cambio conformacional en el receptor que estimula la actividad tirosina quinasa y aumenta la capacidad tumorigénica de las células que lo expresan. Menos frecuentes son las mutaciones que dan lugar a receptores truncados en su extremo C-terminal, lo que puede afectar al dominio tirosina quinasa. Estos receptores truncados se han descrito en algunos sarcomas (Pelley y col. 1989) y en células de carcinoma epidermoide (Ullrich y col. 1990) (figura 12).

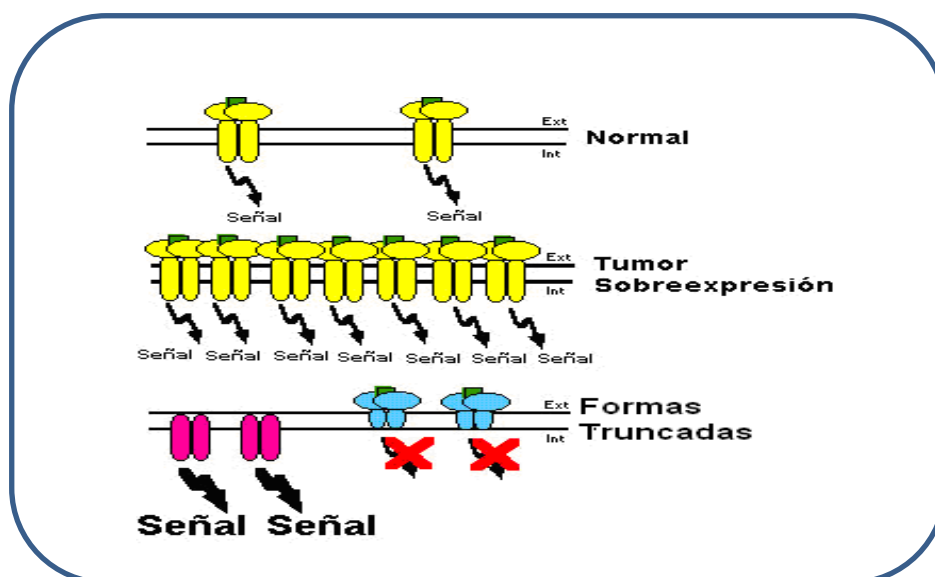


Figura 12. Alteraciones del EGFR en células tumorales. En células normales (*panel superior*) se expresa un número moderado (por ejemplo 53-103 copias por célula) del EGFR (*dímeros en forma de T*) que señalizan adecuadamente. En ciertas células tumorales el EGFR puede sobreexpresarse (por ejemplo 4003 receptores por célula) generando un alto nivel de señalización (*panel central*). Otros tumores expresan formas truncadas aberrantes del EGFR que carecen del dominio extracelular, presentando una actividad tirosina quinasa hiperactiva que señala en ausencia del control ejercido por el ligando (*panel inferior, izquierda*), o formas truncadas que carecen del dominio intracelular y no tienen actividad tirosina quinasa y por lo tanto no señalizan directamente, aunque son capaces de unir el ligando.

Proteína P53

Es una fosfoproteína nuclear de 53 KDa, de vida corta, codificada por el gen supresor de tumores; está localizada en el brazo corto del cromosoma 17 (Isobe y col. 1986). Su función principal es regular el ciclo celular reduciendo los efectos mutagénicos de los daños del ADN, previniendo así la carcinogénesis (Barbatis y col. 1995; Martin y col. 2002). Fue descubierta por Lane y Crawford en 1979, en extractos de células neoplásicas que reaccionaban contra el antisuero de animales con cánceres inducidos por el virus del simio 40 (SV 40) (Perez y col. 2003).

Dominios de la proteína P53

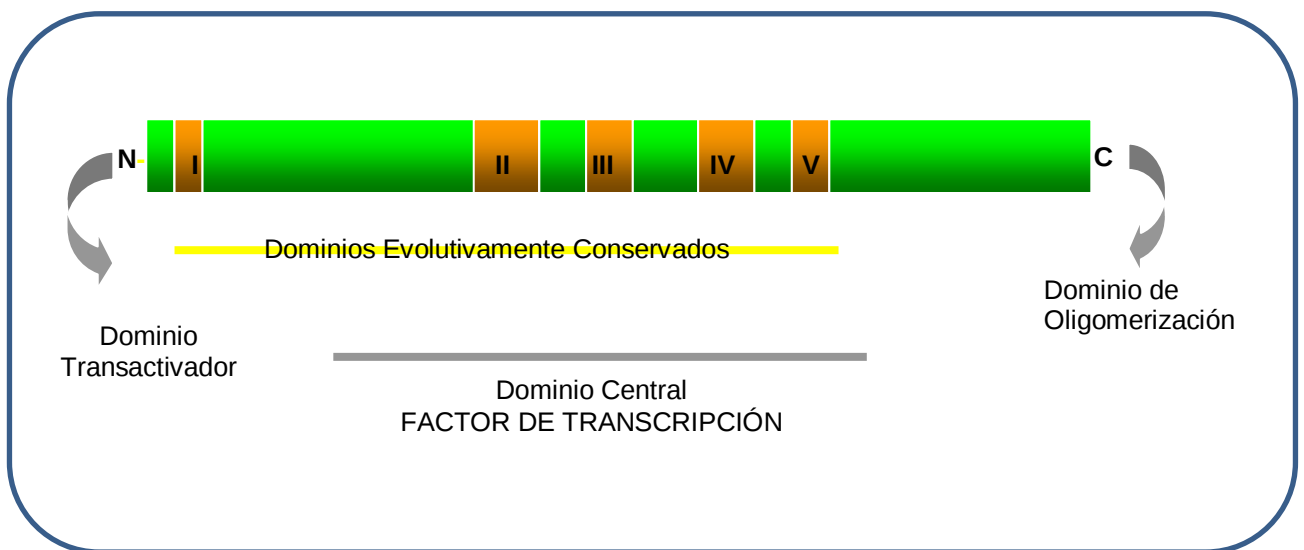


Figura 13.- Regiones de la P53 más conservadas entre especies (I al V).

Como puede observarse en la figura 12, ésta proteína consiste en tres dominios (correspondientes a 393 aminoácidos):

- Un dominio de activación de factores de transcripción o dominio amino terminal.
- Un dominio que reconoce la secuencia específica del ADN (dominio central).
- Un dominio carboxi-terminal o de oligomerización.

P53 y carcinogénesis

Generalmente este gen (*P53*) se ha encontrado mutado en la mayoría de los tumores humanos. Las mutaciones que inactivan la proteína p53 se localizan entre los aminoácidos 117 a 290, distribuidas en cuatro regiones: los residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286, las cuales están muy conservadas entre las distintas especies animales. Entre estas cuatro regiones existen tres "puntos calientes" para las mutaciones, que se localizan en los aminoácidos 175, 248 y 273 (Pérez y col. 2003). Muchas de estas mutaciones estabilizan a la proteína, haciendo posible su detección por inmunohistoquímica, mientras que en células normales la proteína silvestre es indetectable (Soussi y col. 1994). La expresión de este gen supresor de tumores ha sido encontrada con alta frecuencia en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, lo que ha sugerido que anormalidades del gen *P53* puede ser un factor pronóstico en pacientes con CCC (Furihata y col. 1993). Igualmente, la expresión de *P53* mutado ha sido encontrada en lesiones pre invasivas del tracto aerodigestivo, sugiriendo que anormalidades en *P53* probablemente constituyen un evento temprano en el desarrollo de CCC (Dolcetti y col. 1992) y que estas mutaciones llevan a una proliferación descontrolada de células resultando en futuras anormalidades genéticas y finalmente en malignidad (Tommasimo y col. 2003; Triantafillos y col.1987).

La proteína P53 bloquea el ciclo celular induciendo la expresión de la proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas P21 (Harper y col. 1993), la cual bloquea la transición G1-S. La proteína P21 también bloquea directamente la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular, inhibiendo la actividad de la proteína PCNA sobre la ADN polimerasa δ . Además del efecto directo sobre la replicación, la proteína P53 controla la transcripción activando o inhibiendo la expresión de determinados genes (Li y col. 1994) (figura 14).

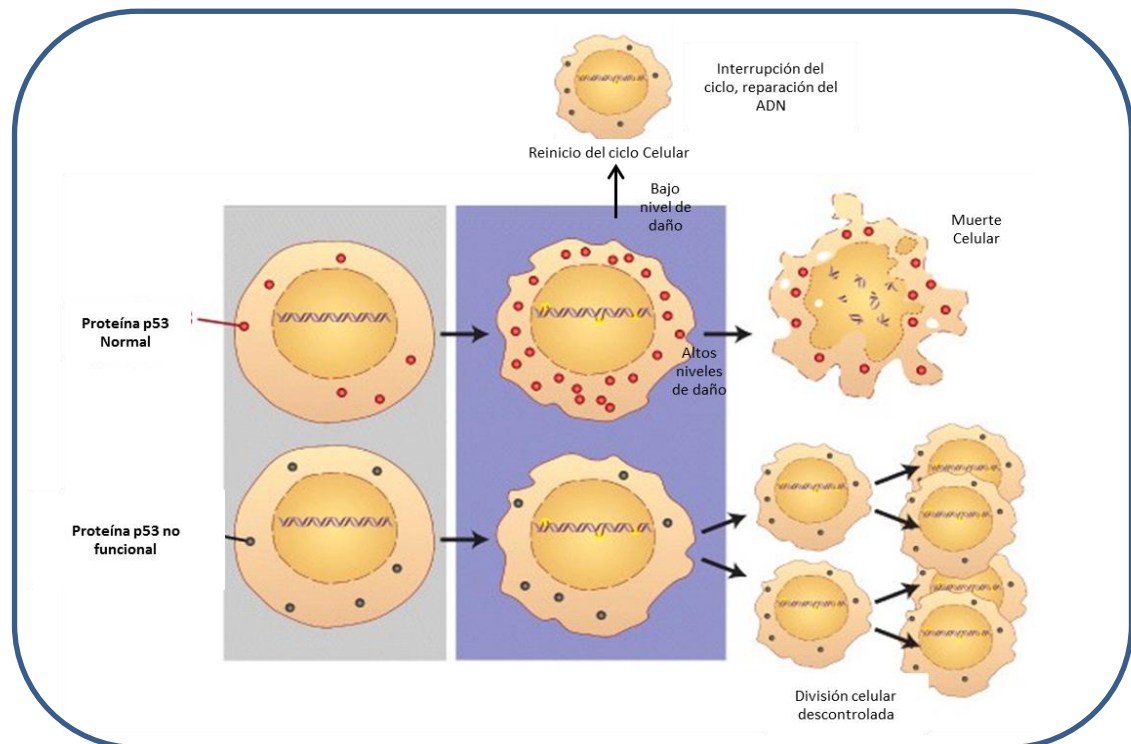


Figura. 14.- Modelo de regulación de la proteína P53. Tomado y modificado de Prokocimer y Rotter 1994

De esta manera, la proteína P53 es capaz de activar genes que poseen secuencias promotoras reconocidas por la proteína. Por otra parte, una concentración elevada de P53 es

capaz de inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* la transcripción de una serie de genes que poseen secuencias TATA (Mack y col. 1993). Este efecto supresor podría estar relacionado con un fenómeno que se observa en células meióticas, donde se transcribe de forma preferente el gen de la proteína P53, y de algunos genes que no utilizan la secuencia TATA. La función de la P53 puede resultar interferida por mutaciones del gen que la codifica o a través de otros mecanismos (Cho y col.1994). Por ejemplo, la oncoproteína MDM2 interacciona con la P53 y bloquea sus funciones (Momand y col. 1992). Otra posibilidad de inactivación es la destrucción proteolítica de la P53 por el sistema dependiente de la ubiquitina. La proteólisis puede ser inducida por proteínas vírales como la E6 producida por VPH; ésta se une a la P53 y promueve la poliubiquitinización de la proteína supresora seguida de la destrucción proteolítica en el proteasoma (Scheffner y col. 1990). Cabe destacar que el material genético de estos VPH oncogénicos ha sido detectado en más del 80% de los carcinomas cervicales y se ha sugerido que la asociación de estos virus con la proteína P53 puede jugar un papel en la habilidad de estos en la transformación celular (Daniel y col. 1996).

Ya se ha mencionado que las lesiones del ADN que no pueden ser reparadas desencadenan la apoptosis a través de la proteína P53. La quimioterapia y la radioterapia a dosis inferiores a las que provocan muerte celular por genotoxicidad son capaces de inducir la apoptosis siempre que esté presente y se encuentre funcionalmente intacta la proteína P53. Se ha observado también que la inducción de la apoptosis por la proteína P53 parece ser independiente de la activación de la transcripción y podría ser una consecuencia de la acción represora de la proteína sobre la expresión de genes esenciales para la supervivencia, o bien podría tratarse de un efecto directo de la proteína P53 sobre la hidrólisis del ADN u otros mecanismos directamente implicados en la apoptosis (Caelles y col. 1994). El déficit funcional

concomitante de las proteínas Rb y P53 es particularmente importante en la patogenia del cáncer ya que muchos tumores muestran mutaciones simultáneas de los genes *Rb* y *P53*, mientras que las células que conservan intacta la proteína P53 pueden, a través de la apoptosis, eliminar las células preneoplásicas (figura 15) (Mezquita y col. 1995).

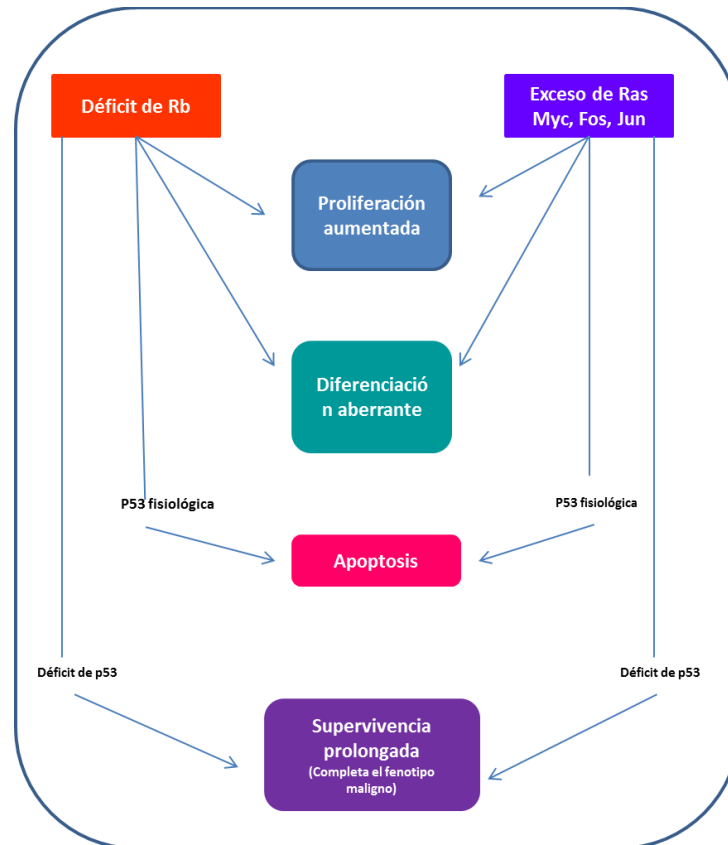


Figura 15.- Adquisición del fenotipo neoplásico a través de la expresión de oncogenes y del déficit funcional de genes supresores. Las proteínas transformantes inductoras del aumento de proliferación y el déficit de la proteína supresora Rb producen una serie de alteraciones fenotípicas preneoplásicas, pero no dan lugar a la transformación maligna gracias a la apoptosis inducida por la proteína P53. Tomado y modificado de Mezquita. 1995.

Las mutaciones del gen *P53* pueden ser causadas tanto por procesos biológicos endógenos como por carcinógenos exógenos. Entre los endógenos se incluyen desaminaciones espontáneas de dinucleótidos ${}^m\text{C}$ a ${}^m\text{CpG}$, resultando en transiciones $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$. Sin embargo la desaminación de ${}^m\text{C}$ puede ser acelerada por factores exógenos como 1- nitropireno o luz UV.

Las deleciones e inserciones son las mutaciones que se observan con frecuencia en *P53* (Liloglou y col. 1997).

Se ha visto que la proteína *P53* no sólo detiene el crecimiento tumoral y es capaz de eliminar las células preneoplásicas induciendo apoptosis, sino que además podría impedir el desarrollo de los tumores sólidos bloqueando la angiogénesis. Entre las proteínas supresoras de la angiogénesis cabe destacar la glucoproteína de la matriz extracelular trombospodina-1 (*TSP-1*), la cual en condiciones fisiológicas es segregada por los fibroblastos y probablemente otras células gracias a la acción de la proteína supresora *P53*. En las células transformadas la ausencia o la alteración funcional de la proteína *P53* disminuye la expresión de la *TSP-1* y en consecuencia se induce la angiogénesis (Dameron y col. 1994).

Trabajos realizados en los que se evaluó la respuesta de *P53* frente a daños del ADN se ha observado que aquellas células con *P53* mutante expuestas a radiación ionizante y/o luz UV no son capaces de detener la división celular lo cual si ocurre en aquellos casos con *P53* silvestre, lo que indica que esta proteína tiene un rol importante en la reparación del ADN (Smith y col. 2002), y se ha descrito como un biomarcador de la carcinogénesis oral, también se ha visto que sirve como un intermediario para los programas de prevención de cáncer (Smith y col. 2002).

En general, en tumores de cabeza y cuello se ha obtenido una inmunorreactividad cercana al 50% en laringe, excepto en el caso de hipofaringe cuyo valor supera el 70% (lo cual es lógico porque habitualmente, de los carcinomas de cabeza y cuello, suelen ser los más agresivos) (Pérez y col. 2003).

B-Cell Lymphoma Two (Bcl-2)

El gen *Bcl-2*, codifica para una proteína de 25 KDa, en cuyo extremo C terminal presenta 21 aminoácidos hidrofóbicos que son importantes para su anclaje a la membrana. La proteína generada se encuentra en el medio intracelular anclada a la membrana mitocondrial externa, la envoltura nuclear y el retículo endoplasmático. Una delección en el dominio C terminal elimina la funcionalidad de la proteína (Petros, y col, 2004).

Su nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*), segundo miembro de un grupo de proteínas inicialmente descrito en estudios de la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 observada en linfomas foliculares. A diferencia de otros oncogenes, *Bcl-2* no estaba originalmente implicado en el control de la proliferación celular sino en el bloqueo de la muerte celular (figura 16), específicamente de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura endonucleolítica del ADN (Danial y col. 2005).

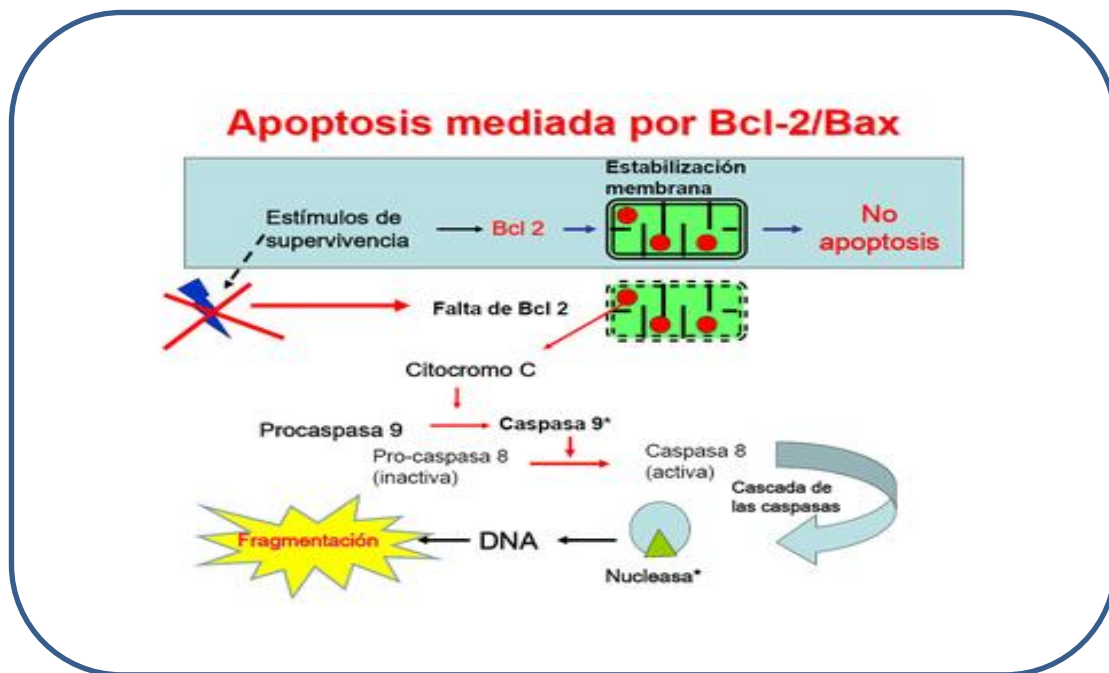


Figura 16.- Esquema de la apoptosis mediada por la familia Bcl-2. Tomado y modificado de Danial y col. 2005.

Siguientes investigaciones demostraron la existencia de dos subfamilias homólogas pro-apoptóticas, Bax y BH3. Bax fue el primer homólogo identificado por su interacción con Bcl-2: Estudios realizados en ratones deficientes en Bax demostraron que presentaban una expansión selectiva de poblaciones celulares y la relación Bcl-2/Bax se descubrió clave en la susceptibilidad a apoptosis por la vía intrínseca (Rebecca y col. 2008).

Sub-familias de Bcl-2

Hasta la fecha se conocen tres sub-familias:

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *MCL-1*, *BCL2A1*, *BCL-B*.
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): *Bax*, *Bak*, *Bok*.

- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): *Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK*.

Estas subfamilias vienen definidas en parte por la homología con cuatro regiones denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH). La subfamilia anti-apoptótica presenta una conservación de los 4 dominios y estudios con *Bcl-W* permitieron determinar que los dominios BH1, BH2 y BH3 eran los responsables de formar una región hidrofóbica de interacción con los dominios BH3 de las pro-apoptóticas, produciendo su inhibición. Los miembros de la subfamilia Bax presentan dominios BH1-3 por lo que también se les conoce como subfamilia “multidominio”, en contraposición con la subfamilia BH3 que sólo presenta homología en el mínimo dominio de muerte celular, la hélice anfipática BH3 (Rebecca y col. 2008).

Mecanismos de Acción

Ante una señal de muerte celular BAX se inserta en la membrana externa mitocondrial en forma de homooligómero y BAK sufre a su vez un cambio conformacional que incluye su oligomerización y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la liberación de factores del espacio intermembrana como el citocromo c, (figura 17). El mecanismo exacto de esta liberación se desconoce aunque se plantean dos teorías principales. La primera postularía que las formas oligoméricas de BAX y BAK crearían poros capaces de liberar el citocromo c basándose en su similitud con toxinas bacterianas formadoras de poros y en la evidencia de experimentos *in vitro*. La segunda teoría afirmaría que BAX y BAK interaccionarían con moléculas intrínsecas de membrana y producen una transición de

permeabilidad. Estos mismos procesos tendrían lugar en el retículo endoplásmico mediando la liberación de Ca^{2+} (Rebecca y col. 2008).

Los miembros de la subfamilia BH3 funcionarían como iniciadores de la vía que integraría de forma selectiva las diversas respuestas específicas de muerte y supervivencia. Por ejemplo, la caspasa-8 activada por señales de receptores de muerte celular en superficie origina una serie de modificaciones de la proteína BID que servirá como ligando para favorecer la oligomerización de Bax y Bak y, por lo tanto, su activación. La actividad de esta subfamilia está regulada a nivel transcripcional y postraducciona, por factores como *p53* en respuesta a daño genético o por fosforilación en respuesta a factores de crecimiento. Actualmente se estudia si todas las moléculas de la familia BH3 tendrían funciones idénticas o podrían llegar a ser incluso excluyentes entre sí (Hinds 2007).

Se ha visto también que la activación de la caspasa 9 por la mitocondria es un punto central de la apoptosis, donde la asociación de los dominios BH4 de Bcl-2 y Bcl-XL al dominio C terminal de Apaf-1 puede inhibir la asociación de la caspasa 9 con Apaf-1 y por ende se inhibe la apoptosis (Hinds 2007).

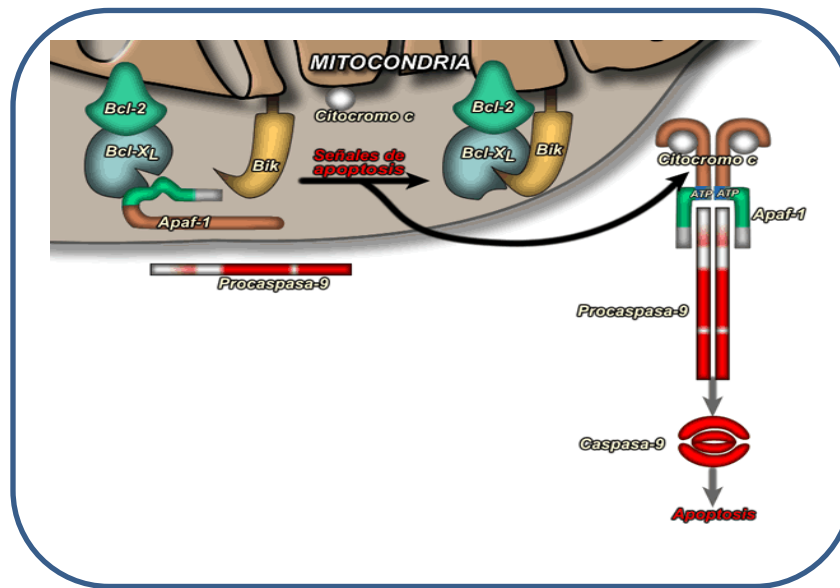


Figura 17.- Mecanismo de acción de la familia Bcl-2. Tomado de <http://gmein.uib.es/registro/informacion/investigadores/informacion361.htm>.

En resumen, los miembros de la familia Bcl-2 controlan la apoptosis bloqueándola o induciéndola y se encuentran principalmente anclados en la membrana mitocondrial externa y en otras membranas donde se generan iones superóxido (Hockembery y col. 1993). A partir de estos iones, la superóxido dismutasa genera agua oxigenada, la cual está en presencia de Fe (hierro) o Cu (cobre), da lugar a radicales libres hidroxilo que son capaces de alterar las membranas celulares, el ADN y las proteínas de forma muy similar a la observada en la apoptosis (Hockembery y col. 1993).

La proteína Bcl-2 es capaz de ejercer un efecto protector frente a la acción destructora del radical hidroxilo y bloquea la apoptosis (Mezquita 1995).

Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear de 359 KDa que está asociada con la proliferación celular, ya que se expresa en las fases activas (G2-M) del ciclo de división celular pero ausente en células en reposo (Bina y col. 2005). También está asociada con la transcripción ribosomal (Bullwinkely col. 2006; Shozen y col. 2000). Este antígeno es considerado como un marcador de proliferación correlacionado con la presencia y severidad de las displasias epiteliales (Bina y col. 2005), y ha sido usado para evaluar la actividad proliferativa de una lesión (Özel y col. 2004).

Así, esta proteína es excelente para evaluar la fracción de crecimiento de una población celular determinada. La fracción del tumor con células Ki-67 positiva a menudo se correlaciona con la evolución clínica del cáncer. Los ejemplos mejor estudiados en este contexto son carcinomas de próstata y de cerebro, pues para estos tipos de tumores, el valor pronóstico para la supervivencia y la recurrencia del tumor ha sido repetidamente demostrado en análisis multivariado (Scholzen 2000).

Según trabajos realizados por Bina y col (2005), en la India, se observó un promedio menor al 50% de células marcadas con una alta intensidad respecto a esta proteína, lo cual podría contribuir con la determinación de la susceptibilidad a desarrollar cáncer en la mucosa oral, a partir de una incrementada proliferación celular.

En este sentido, Wangsa y col (2008) han señalado que la actividad proliferativa de las células es determinada en muchos casos por los niveles del antígeno nuclear Ki-67, el cual ha sido asociado al pronóstico, tratamiento y predicción de cáncer.

Los autores evaluaron valor de Ki-67 como marcador predictivo de la recurrencia en pacientes con carcinoma de la cavidad oral en estadio I; mediante ensayos inmunohistoquímicos a dichas muestras obtuvieron 17 a un 90% de positividad para Ki-67, los cuales no estaban asociados con una recurrencia en tumores en estadios II-IV. Sin embargo, los autores observaron una elevada correlación entre la expresión de dicho marcador y la recurrencia en tumores primarios en estadio I. Concluyen que la alta actividad proliferativa (>50%) se relaciona con un elevado riesgo de recurrencia en pacientes con tumores en estadio I, haciendo a Ki-67 un potencial marcador para determinar a aquellos pacientes que necesitan tratamientos más extensivos (como cirugías que sobrepasan los márgenes del tumor, disección del cuello y radioterapia post operativa).

Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (*Proliferation Cellular Nuclear Antigen*)-PCNA

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular, PCNA (de sus siglas en Inglés: “proliferation cellular nuclear antigen”) fue originalmente identificada como un antígeno que es expresado en el núcleo de las células durante la fase de síntesis del ADN en el ciclo celular (Leonardi y col. 1992). Parte de esta proteína fue secuenciada y ésta secuencia fue utilizada posteriormente para el aislamiento de (ADN complementario) ADNc (Matsumoto y col. 1987). Se ha visto que PCNA ayuda a la ADN polimerasa delta (pol δ) en el proceso de resíntesis del ADN dañado y en el cambio de bases erróneas, por lo que juega un papel importantísimo en la síntesis y reparación del ADN (Shivji y col. 1992; Essers y col. 2005).

PCNA también está involucrada en la tolerancia ante daños al ADN conocida como reparación post-réplica (PRR) (Lehmann y col. 2006). Para esta reparación se han descrito dos sub-rutas:

- 1.- Una ruta de traducción llevada a cabo por ADN polimerasas especializadas que son capaces de incorporar bases en sitios activos de ADN dañado (Hoege y col. 2002).
- 2.- Un mecanismo conocido como interruptor de templado, en el cual se establece de un bypass (puente) sobre el ADN dañado mediante el reclutamiento de una maquinaria homóloga a la de replicación (Hoege y col. 2002).

Antecedentes

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada año hay aproximadamente 10 millones de nuevos casos de cáncer y que de las 58 millones de muertes que se registraron en el mundo en el 2005, 7,6 millones se debieron esta patología (OMS).

Según Ringtrom y col. (2002) en los Estados Unidos se registraron 45 000 nuevos casos de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello, mientras que datos más recientes muestran que esta malignidad es mucho más común, especialmente en Europa constituyendo el 7% de todas las neoplasias siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres (Arias y col. 2007). Una investigación realizada por Badulescu y col. (2010) mostró que de 650 000 casos de CCC registrados en el mundo para la fecha, mueren aproximadamente 350 000 a causa de esta malignidad.

Las estadísticas de la Sociedad Americana de Cáncer, durante el año 2007, diagnosticaron aproximadamente 11 300 nuevos casos de CCC y se registró la muerte de 3660 personas por esta enfermedad.

Es importante destacar que la gran mayoría de CCC se presenta en varones, aunque hay una proyección a futuro que estima un aumento en el número de casos en el género femenino, debido fundamentalmente a la más reciente incorporación de las mujeres a las prácticas de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco. En relación a la edad, se ha reportado que la incidencia de CCC es mayor a partir de los 50 años, aunque pueden presentarse a partir de la tercera década de la vida (Arias y col. 2007). El tipo de cáncer de cabeza y cuello más común es el carcinoma de células escamosas, el cual procede de tejidos epiteliales como la piel o de los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales. Se estima que entre 85 y 90% de los casos con CCC son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición; así, los fumadores intensos tienen un riesgo superior respecto a los fumadores ocasionales. Como se mencionó, desafortunadamente, se prevé un incremento en la incidencia de estas neoplasias, ya que en las últimas décadas se ha registrado un importante incremento en la frecuencia de tabaquismo, principalmente en los individuos jóvenes y mujeres (Spitz y col. 1988).

El consumo de alcohol es otro de los factores más importantes asociado al cáncer en seres humanos, después del tabaquismo, las infecciones crónicas y posiblemente la obesidad (Boffetto y col. 2006). Sin Embargo, el cáncer en la nasofaringe no parece estar asociado al tabaco y al alcohol, pues en carcinomas de esta localización anatómica, el virus de Epstein-Barr (EBV) es detectado consistentemente con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la

infección y sus efectos son un importante factor epidemiológico en esta patología (Paredes y col. 2004), cabe mencionar que la infección por este virus ha sido asociada a diversas enfermedades y malignidades entre las que se pueden mencionar: Mononucleosis infecciosa, enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin entre otros (Cohen y col. 2000).

En un estudio realizado en muestras de pacientes Israelíes con carcinoma nasofaríngeo, se detectó la presencia del VEB mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpo monoclonal anti-LPM1, obteniéndose menos del 50% de positividad, mientras que mediante hibridación se encontró un porcentaje mayor a 50% (>50%). Este estudio permite a los autores confirmar que existe una asociación general entre el VEB y el carcinoma de nasofaringe y que las diferencias entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y por hibridación se deben básicamente a que la primera técnica depende de la concentración de LMP-1 en el citoplasma de las células tumorales mientras que la segunda se basa en la amplificación biológica natural de la secuencia blanco que resulta en numerosos transcritos de EBER.

Se ha determinado que este tipo de carcinoma es el más predominante en el sur de China con una incidencia de 50 por cada 100 000 personas diagnosticadas al año, así como en el norte de África y Alaska (Cohen y col. 2000).

Diferentes estudios han demostrado que el 100% de los carcinomas anaplásicos o pobremente diferenciados contienen el genoma del VEB, el cual se encuentra en las células epiteliales transformadas, y los pacientes diagnosticados presentan elevados títulos de IgA contra proteínas estructurales del virus. Estos análisis de anticuerpos han sido de gran ayuda en China para la detección precoz de carcinoma nasofaríngeo y para la valoración de la

respuesta al tratamiento, ya que el aumento de estos títulos se relaciona con un gran riesgo de desarrollar la malignidad (Cohen y col. 2010).

Estas afirmaciones concuerdan con los resultados reportados por Gelardi y col. (2006), quienes evaluaron muestras de células nasales con morfología de racimos multinucleados de un paciente con carcinoma de nasofaringe (sin historia de hábitos de tabaquismo) mediante serología, reacción en cadena de la polimerasa en suero, y determinaron que la infección por VEB que fue posteriormente confirmada mediante microscopía electrónica. A partir estos resultados los autores concluyeron que es recomendable la realización de la evaluación clínica de todos los neoplasmas nasales, así como de citologías rutinariamente, y cuando estas muestras son positivas para VEB debe realizarse una endoscopia nasal y de nasofaringe para detectar evidencia de un posible carcinoma nasofaríngeo.

Fenómeno semejante ocurre con relación a las fosas nasales y senos paranasales, donde se señala que la exposición a ciertos metales, (como el aluminio, el níquel y el cromo); a cloro fenoles y fibras orgánicas, propios de las industrias mobiliarias, textil y peletera, podrían tener un papel importante en la génesis de estos tumores (Battista y col. 1995).

Actualmente existen evidencias epidemiológicas y moleculares de que el Virus de Papiloma Humano (VPH) está relacionado con un el cáncer de células escamosas como el carcinoma cervical (Martinez y col. 2007), la infección sexualmente adquirida podría alterar la epidemiología y demografía del cáncer de las vías aerodigestivas. En consecuencia, el diagnóstico de cáncer de células escamosas positivo para VPH pudiera ser clínicamente relevante con fines de pronóstico, además de tener futuras implicaciones diagnósticas y terapéuticas, incluyendo la prevención (Haigentz y col. 2005). Además, los virus del herpes

simple (Parker y col.2006), factores nutricionales, higiene bucal y predisposición genética, también han sido señalados como factores de riesgo en el CCC (Rosenquist y col. 2005).

El VPH ha sido aceptado como un agente etiológico en el carcinoma cervical y su asociación con CCC fue establecida en 1985; a partir de la relación ya conocida con el carcinoma de células escamosas de cérvix (Liviu y col. 2010). Un grupo de investigadores propone que la ausencia del genoma de VPH en ciertos carcinomas no excluye la posibilidad de que el virus haya tenido una participación importante en la génesis de la malignidad, ya que las manifestaciones de las infecciones son frecuentemente transitorias (Mork y col. 2001), durante la transformación de la célula hospedera y el desarrollo de carcinogénesis se pueden perder las secuencias (Syrjanen y col. 2003). Sin embargo se ha comprobado que la persistencia de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo parecen ser necesarias para la perpetuación del virus asociada a la progresión de la malignidad, lo cual ha sido evidenciado en estudios realizados en carcinomas de cuello uterino (Gillison. 2006).

La evidencia sobre el papel del VPH de alto riesgo en el cáncer de cuello uterino incluye la presencia de secuencias genómicas de estos virus y la expresión transcripcional de las proteínas E6 y E7 activas en el núcleo de células tumorales malignas, la integración del ADN viral en el genoma celular y por último, pero no menos importante, a través de la determinación del número de copias del ADN viral (Gillison. 2006) se ha demostrado que existe una asociación entre la carga viral y la génesis del cáncer, pues un incrementado número de copias presenta un riesgo incrementado en cáncer cervical (Wang y col. 2003).

En este sentido, Seaman y colaboradores (2010) realizaron un estudio con biopsias de pacientes provenientes del Healthcare Center desde 1995 hasta 2010, diagnosticadas

histológicamente como cáncer de las regiones ano genital, cutánea y oral; que fueron analizadas para la detección y cuantificación de VPH; hallaron que los genotipos 6, 11, 16 y 18 eran los más frecuentes y que cada uno se encontraba en un rango de 2×10^1 hasta 2×10^6 copias /reacción.

De manera similar Carrea-Cáceres y col. (2007), evaluaron 100 muestras de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello en México para la detección de VPH mediante PCR utilizando los primers MY09/MY11 y GP5+/GP6+ y la amplificación del gen de β globina como control interno, donde detectaron el genoma del VPH en 72% de las muestras; 61,5% en carcinomas en la cavidad oral, 74% de laringe y 100% en orofaringe. El VPH genotipo 16 fue el más frecuente con una prevalencia de 47%.

Así numerosos estudios epidemiológicos y moleculares sugieren que los VPH de alto riesgo oncogénico especialmente los genotipos 16 y 18, están etiológicamente relacionados a un sub conjunto de cánceres de cabeza y cuello, especialmente carcinoma de células escamosas de orofaringe, señalándose que la infección por VPH en la orofaringe puede predisponer a la tumorigénesis (Badelescu y col. 2010; Gillison y col. 2000; Mork y col. 2001, Burns y col. 2005). Por otra parte, también se ha reportado la presencia de VPH de bajo riesgo (tipo 6 y 11) en algunos carcinomas orales y carcinomas laríngeos (Chen y col. 2005).

Jiménez y col (2001) reportaron que la lesión más frecuente detectada en la cavidad bucal es el papiloma de células escamosas, siendo los tipos de VPH más importantes encontrados en lesiones benignas 6 y 11, habiéndose encontrado además el tipo 16, de alto riesgo, en una de las pacientes, también se ha demostrado la presencia de VPH en otros tipos de carcinomas. Correnti y Col. (2004), obtuvieron un 50% de positividad en pacientes

diagnosticados con carcinomas de la cavidad oral, presentándose en una mayor proporción en la población femenina, y es importante mencionar que aunque una asociación entre el cáncer oral y el VPH no ha sido totalmente comprobada, las evidencias acumuladas apuntan a que la infección con este virus puede jugar un papel determinante en la carcinogénesis oral. En este orden de ideas, hay que considerar que el 15-20% de los pacientes diagnosticados con CCC no presentan una historia de tabaquismo o alcoholismo conocida; este grupo incluye a un gran número de adultos jóvenes y mujeres que presentan exposición a otros factores de riesgo como lo son las infecciones virales, entre ellas con VPH y VEB, los cuales como ya se mencionó, han sido asociados con el desarrollo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Ringstrom y col. 2003).

Trabajos realizados por De Petrini y col. (2006), donde se determinó la prevalencia del VPH en un grupo de 40 pacientes con CCC y comparar la viabilidad clínica de los tumores positivos y negativos para la infección, detectaron una positividad para el genoma viral entre 36% a 50%, dependiendo de la localización anatómica, siendo el genotipo 16 el más frecuente; los autores también señalan que aquellos pacientes VPH positivos tenían una mejor expectativa de supervivencia que aquellos pacientes VPH negativos.

En la actualidad se conoce que las infecciones por estos virus pueden llevar a variaciones en la expresión de ciertos marcadores tumorales, los cuales son sustancias producidas o inducidas por las células neoplásicas que reflejan el crecimiento y/o actividad de las mismas y que le sirven de apoyo a los oncólogos para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Se han descrito muchos marcadores biológicos, no obstante estudios recientes

han sugerido un valor pronóstico en los siguientes marcadores: P53, PCNA, Bcl-2, Ki-67 y EGFR que ya fueron descritos en este trabajo.

Una gran variedad de trabajos se ha llevado a cabo para estudiar las variaciones en la expresión de los marcadores tumorales. En el caso de *P53*, cuyo producto puede ser detectado mediante técnicas inmunohistoquímicas cuando ha sufrido mutaciones (Ogden y col. 1992, Bartek y col. 1990). Golusinski y col. (1998), reportaron 70% de positividad en carcinoma epidermoide de laringe. Por otro lado Pruneri y col. (1998), encontraron un 50,1% de positividad; Hirvikoski y col. (1997) registraron un 68% de positividad para P53 mientras que Xie y col. (1997), encontraron también una positividad del 54,8% en pacientes diagnosticados con carcinoma epidermoide de laringe e hipofaringe.

Para evidenciar la importancia del papel de P53 normal en la reparación del ADN, Li y Ho (1998) evaluaron pares de líneas celulares con P53 normal y mutante las cuales fueron sometidas a mutágenos como por ejemplo Radiación Ionizante (IR) y dosis sub-letales de UV; los resultados de esta investigación muestran que aquellas células con P53 normal fueron capaces de detener el ciclo de división celular mientras que aquellas líneas celulares con P53 mutante no fueron capaces de hacerlo, indicando que P53 juega un papel importante en la reparación del ADN dañado (Martin y col. 2002).

Kessi y col. (1993) evaluaron si la respuesta normal del epitelio cervical a daños en el ADN puede ser determinada por interacciones entre la proteína E6 de VPH de alto riesgo y tipos silvestre de P53. Para ello los autores expresaron la proteína E6 de VPH tipo 16 en una línea celular de carcinoma de colon humano (RKO) lo cual resultó en niveles indetectables de P53 y pérdida del arresto en G₁ que normalmente ocurre en estas células posterior a daños en

el ADN. Estos hallazgos demostraron que la proteína E6 de genotipos oncogénicos de VPH pueden interrumpir una respuesta celular importante ante daños del ADN mediada por P53, contribuyendo a la subsecuente acumulación de cambios genéticos asociados a la tumorigénesis cervical.

De manera similar se ha visto que ocurre con la familia Bcl-2, cuya actividad está regulada a nivel transcripcional y postraducciona, por factores como P53 en respuesta al daño genético o por fosforilación en respuestas a factores de crecimiento (Laundasku y col. 2001).

Se ha reportado que en numerosos tumores humanos hay una sobreexpresión de *Bcl-2* y se piensa que esto puede contribuir a la progresión del tumor y un incremento en la resistencia a las drogas utilizadas (Elzagheid y col. 2006). El efecto oncogénico de *Bcl-2* es similar al observado cuando el gen *P53* es inactivado (Pezzela y col. 1990). Además se ha demostrado que específicamente en carcinoma de nasofaringe que tanto el gen *Bcl-2* como el gen *P53*, suelen ser expresados en lesiones histológicas bien diferenciadas, sugiriendo una correlación entre la expresión de estas proteínas y la diferenciación celular en el tumor del carcinoma nasofaríngeo (Kouvidou y col 1995).

Se han realizado estudios para evaluar el papel de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 y su relación con la poca respuesta frente a los tratamientos empleados en pacientes con carcinoma de células escamosas de orofaringe. Al respecto Michaud y col. (2009) observaron que en las líneas celulares de CCC había una altísima expresión de *Bcl-2* asociada a un incremento en la resistencia a las terapias, por lo que sugieren que la detección mediante inmunohistoquímica de los miembros de esta familia puede mostrar la capacidad del

paciente de resistir al tratamiento y a su vez le permitirá al oncólogo plantear el esquema de tratamiento más conveniente a ser empleado (Michaud y col. 2009).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor transmembrana miembro de la familia de tirosina quinasa (TK), que al igual que otros receptores TK traduce señales tanto del exterior como del interior celular y juega un papel importante en numerosos procesos que afectan la evolución tumoral, incluyendo crecimiento, progresión, diferenciación, inhibición de apoptosis y desarrollo de la metástasis (Blume y col. 2001).

La sobreexpresión de EGFR se ha observado desde un 40% a un 80% de los cánceres de cabeza y cuello (Quon y col. 2001) y la naturaleza de esta sobreexpresión parece radicar en un aumento de la transcripción de los genes que codifican para el EGFR (Grandis y col. 1993). Se han realizado numerosos trabajos que dan al EGFR un valor pronóstico independiente y establece una mayor probabilidad de recidiva post-tratamiento y una menor probabilidad de supervivencia si EGFR está sobreexpresado (Grandis y col. 1998). En los últimos años ha existido un interés especial en esta proteína no solo por su posible valor pronóstico sino también porque es blanco de algunos agentes terapéuticos cuya eficacia ha sido demostrada en determinados tipos de cáncer como por ejemplo en cáncer de células no pequeñas de pulmón donde ha sido arduamente estudiado.

Actualmente, los avances en el entendimiento de las rutas de señalización con aberraciones en varios tipos de células cancerígenas han emergido como candidatos para el tratamiento del cáncer basado en la utilización de anticuerpos monoclonales (ACm), moléculas pequeñas, pequeños péptidos y oligonucleótidos anti sentido (Kohzoh y col. 2006).

Moléculas claves en la señalización, como proteínas tirosina quinasa representan un buen blanco para pequeñas moléculas inhibidoras que compiten con ATP e inhiben la actividad quinasa. Con inhibidores de tirosina quinasa se han obtenido respuestas clínicamente efectivas en leucemia mieloide crónica, tumores gastrointestinales y cáncer de células no pequeñas de pulmón (Kohzoh y col. 2006), mientras que la aplicación de anticuerpos monoclonales mejoró las tasas de respuesta en pacientes con linfomas malignos y recientemente comienza a ser utilizada en otros tipos de tumores (Kohzoh y col. 2006).

Con respecto a esto, Altuna y col. (2005) evaluaron mediante inmunohistoquímica 44 casos de pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en el hospital de San Diego, California (EUA), donde obtuvieron un 41% de positividad para EGFR, y aunque no encontraron relación con el pronóstico de los pacientes, destacaron la importancia de la detección de este marcador debido a la existencia de fármacos y agentes químicos capaces de inhibir su actividad.

La proliferación celular es uno de los mecanismos biológicos más importantes en la oncogénesis, pues un examen a los resultados de un gran número de estudios ha mostrado que la actividad proliferativa es de alto valor pronóstico en distintos tipos de cáncer (Pich y col. 2004).

Uno de los biomarcadores más estudiados es el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) cuya actividad es la regulación de la síntesis del ADN como auxiliar de la ADN polimerasa (Sarac y col 1998). La expresión de este marcador ha sido estudiada en numerosas neoplasias humanas y el Índice Proliferativo (IP) se ha correlacionado con el pronóstico de linfoma no-Hodking (Klemi y col. 1992), cáncer gástrico (Jain y col 1991),

cáncer de mama (Tahan y col. 1993), cáncer de ovario (Hartmann y col. 1992) y cáncer de faringe (Pich y col. 1992). Este IP también ha sido utilizado para predecir la respuesta a la radioterapia y quimioterapia, reportándose una mejor respuesta al tratamiento en aquellos casos de pacientes con cáncer cervical y de laringe con mayor proliferación (Munck-Wikland y col. 1993).

Munck-Wikland y col. (1994), realizaron un estudio de 38 pacientes con carcinoma *in situ* de laringe que progresaron hacia carcinoma invasivo, los cuales mostraron una alta tinción para PCNA y una mayor frecuencia de positividad para P53; por la combinación e interpretación de estos resultado los autores clasificaron a 82% de estas lesiones como progresoras o no progresoras. Por su parte, Welkoborsky y col. (1995) encontraron que la positividad para PCNA estaba altamente asociada con el pronóstico, mientras que no hallaron correlación entre PCNA y la recurrencia de la enfermedad.

En otro estudio realizado por Sarac y col. (1998) se evaluó el valor pronóstico de PCNA en carcinoma de laringe. Las muestras correspondieron a 92 pacientes elegidos al azar en el departamento de otorrinolaringología, cirugía de cabeza y cuello, en Ankara-Turquía, las cuales fueron evaluadas por inmunohistoquímica para la expresión de PCNA. Obtuvieron que el índice de expresión de PCNA se correlaciona con el grado, invasión linfocascular, profundidad de los márgenes del tumor y pronóstico, y que aquellos pacientes con metástasis oculta tenían un mayor índice de expresión de PCNA que aquellos pacientes sin metástasis. Esto les permitió concluir que el índice de PCNA es una variable muy sensible para predecir la proliferación del tumor, metástasis oculta de nódulos linfáticos y pronóstico, sugiriendo que PCNA puede ser usado como el pronóstico de carcinoma de laringe.

Otro de los marcadores de proliferación empleado para el estudio de CCC es Ki-67, el cual está asociado con la proliferación celular ya que se expresa en las fases activas (G2-M) del ciclo de división celular pero ausente en células en reposo (Bina y col. 2005). Por lo tanto, la proteína Ki-67 puede ser empleada para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas. Estudios previos han demostrado que los altos índices de Ki-67 observados en carcinomas de células escamosas de la cavidad oral estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un mal pronóstico (Llamaron.2004).

La capa basal del epitelio oral es la zona donde en condiciones normales se ubica el compartimento celular en proliferación, mientras que la capa suprabasal incluye las zonas de maduración celular. La detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un marcador objetivo de la presencia de displasia epitelial (González y Rodríguez. 2000).

Justificación

El cáncer es un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo el cáncer de cabeza y cuello la octava causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Una de las causas primordiales en el desarrollo de esta malignidad es una fuerte asociación entre la predisposición genética y el ambiente en el que se encuentren los individuos.

Actualmente se conocen diversos factores envueltos en la carcinogénesis, entre los que se pueden mencionar la edad, etnicidad, estilo de vida, estatus de salud, y exposición a uno o más factores oncogénicos, entre los cuales el tabaco y el alcohol son los de mayor impacto ya que están bien documentados con una fracción atribuible de un 90%, sin embargo entre el 15 y 20 % de los casos reportados de CCC no presentan una historia de exposición al alcohol o tabaco conocida. Por lo que entran en juego otros agentes, como las infecciones virales las cuales están siendo investigadas en la actualidad, entre las que se destacan la infección por VPH y por el VEB. En particular el VPH es ampliamente reportado como uno de los agentes importantes en el desarrollo de cáncer cervical y que también puede ser considerado como un factor etiológico en la carcinogénesis oral ya que estos virus pueden llegar a esta localización anatómica a través de sexo oral. Es importante mencionar que estudios realizados indican que la carga viral se asocia con la severidad de la lesión y que además la persistencia de genotipos de alto riesgo resulta en la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera, lo que se relaciona con la progresión de lesiones de cuello uterino y recientemente en carcinoma de orofaringe.

Existen numerosos reportes de detección del genoma del VPH en cáncer oral con tasas que llegan a alcanzar el 100% de los casos estudiados, y en algunos de estos casos positivos para el genoma viral presentan un impacto en la expresión de diversos marcadores

moleculares los cuales son considerados como la “huella digital” de un tumor en particular, definiendo la viabilidad biológica de cada uno.

En base a que en las últimas décadas las revisiones científicas han mostrado un interés creciente en los marcadores biológicos expresados en células cancerígenas para utilizarlos como un índice de la progresión y agresividad de estos tumores y así como la relación existente con la detección de VPH y del VEB se despierta nuestro interés en evaluar los distintos factores de riesgo para el desarrollo de esta malignidad.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar de la expresión de marcadores tumorales y de la infección por Virus Papiloma Humano y Epstein-Barr en la etiología del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

Objetivos específicos

- Detectar el genoma de VPH en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello
- Realizar la genotipificación de aquellas muestras que resultaron positivas para la presencia del genoma viral.
- Evaluar la carga viral de VPH en las muestras positivas para virus de alto riesgo oncogénico (VPH-16).
- Evaluar la integración del genoma viral al genoma celular mediante el análisis de la ruptura del gen *E2* de VPH genotipo 16.
- Detectar el genoma del Virus de Epstein-Barr en muestras de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

- Evaluar la expresión de marcadores de proliferación celular (*PCNA* y *Ki-67*) y de oncogenes (*P53* y *Bcl-2*) en muestras de pacientes con CCC mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Evaluar la de la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Relacionar el estadio tumoral con la presencia del genoma del VPH y VEB.
- Relacionar la infección viral (VPH y VEB) con la variación en la expresión de los marcadores tumorales.

Materiales y Métodos

Material Biológico

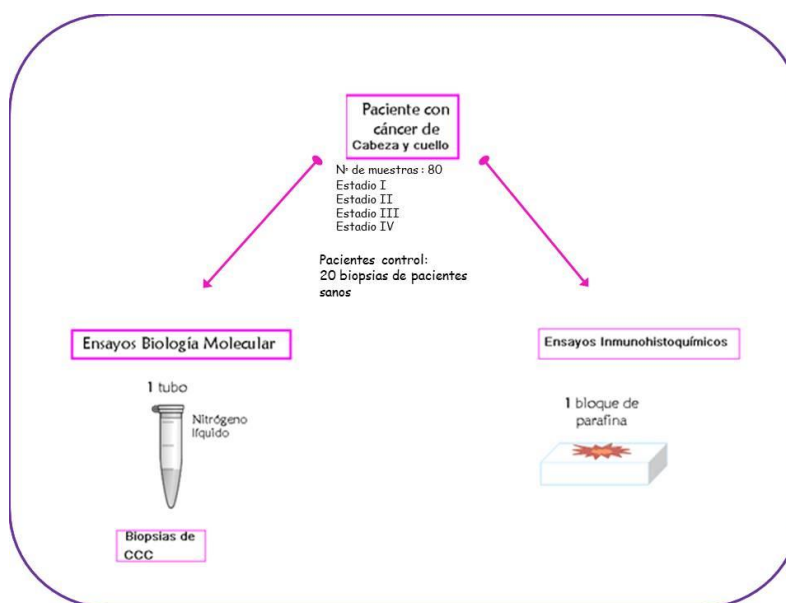
La muestra biológica correspondió a 80 biopsias frescas y bloques parafinados de tumores de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, recolectadas por el Dr. Juan F. Liuzzi en el Hospital Oncológico “Padre Machado”-Caracas. Igualmente se evaluaron 20 biopsias de sujetos sanos, las cuales correspondieron a una porción del triángulo retromolar que se obtuvo mediante cirugía en el proceso extracción de terceros molares retenidos en el Postgrado de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela.

Cada paciente incluido en este estudio debió expresar su aprobación mediante la firma de un consentimiento informado así como respondiendo a una encuesta evaluada y aprobada por el comité de bioética del Instituto de Biomedicina, la cual se encuentra enmarcada en los proyectos FONACIT G-2005000408, 2013000413 y Misión Ciencia 20074001088.

Estas biopsias, una vez extraídas mediante cirugía fueron cortadas en tres secciones, una de ellas se envió para el análisis histopatológico, otra se congeló para análisis de biología

molecular (detección, tipificación, cuantificación e integración del Virus de Papiloma Humano así como detección del genoma del Virus de Epstein Barr) y la sección restante fue embebida en parafina y se utilizó para realizar los ensayos inmunohistoquímicos.

Plan de Toma de Muestras



Esquema 1.- Plan de toma de muestras

Criterios de selección:

- Inclusión:
 - * Pacientes atendidos en el Hospital Oncológico Padre Machado.
 - * Con diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en estadios I, II, III, IV.
 - * Que aceptaron de forma voluntaria participar en el estudio.
- Controles:
 - * Tejido de la cavidad bucal obtenido de la mucosa de sana de pacientes a quienes se les realizó extracción de terceros molares retenidos. Los cuales fueron

recolectados en el postgrado de cirugía bucal de la facultad de odontología de la Universidad Central de Venezuela

- Exclusión:

- Que no acepten participar en el estudio.
- Pacientes HIV positivos
- Pacientes que hayan recibido tratamiento de radioterapia y/o quimioterapia.

Tamaño de la muestra: 100 biopsias, distribuidos en:

- Estadio I
- Estadio II
- Estadio III
- Estadio IV
- Controles (20 muestras)

Ensayos de Biología Molecular

Extracción del material genético

La extracción de ácidos nucleídos se realizó mediante la utilización del estuche comercial DNA mini kit QIAGEN (250) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

De cada biopsia se cortó una porción de aproximadamente 25 mg de tejido y este a su vez fue cortado en trozos pequeños e incubados en buffer ATL (180µl) y 20µl de proteinasa K durante toda la noche a 56°C en agitación. Posteriormente se agregaron 200µl de buffer AL, mezclando en vortex durante 15 seg e incubado a 70°C durante 10 minutos.

Se añadió 200 µl de etanol absoluto, posteriormente se trasvasó a una columna y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto. Se añadió 500 µl de buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto; se añadió 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a 20.000 x g durante 3 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de buffer AE, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto. El material genético recolectado será guardado a -80°C hasta su uso posterior.

Detección y Tipificación del Virus de Papiloma Humano

La detección y tipificación del VPH se realizó empleando el estuche comercial INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics®- BIotechnology for Healthcare).

Este ensayo consistió en una hibridación reversa que está destinada para la identificación de 28 genotipos de VPH mediante la detección de secuencias específica de la región L1 del genoma de VPH, a través del empleo de iniciadores SPF10, los amplificadores biotinilados resultantes se desnaturalizaron y se hibridaron con sondas de oligonucleótidos específicas. Se utilizaron también iniciadores para la amplificación del gen humano HLA-DPB1 a fin de controlar la calidad de la muestra y la extracción. El revelado se realizó con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, la cual se unió a cualquier híbrido biotinilado formado con anterioridad.

Procedimiento

- Posterior a la amplificación, la cual se basa en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el estuche comercial INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp

(Innogenetics®- BIotechnology for Healthcare) se llevó a cabo el proceso de hibridación y revelado.

a. Hibridación y revelado

- Se colocaron 10µl de solución desnaturalizante en cada cubeta y se añadió 10µl de cada producto amplificado biotinilado a la solución de desnaturalización, se añadieron cuidadosamente 2 ml de solución de hibridación y se incubó a 49°C en agitación (80 rpm) durante 60 minutos.
- Se aspiró el líquido de cada cubeta y se añadieron 2 ml de solución de lavado astringente dos veces. Se agregaron 2 ml más de solución de lavado astringente y se incubó en agitación a 49°C durante 30 minutos.
- Se lavó cada tira con 2 ml de solución de lavado diluida durante un minuto. Se añadieron 2 ml de solución conjugada a cada cubeta y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación. Seguidamente, se lavó cada tira dos veces con solución de lavado diluida y una vez con 2 ml de buffer sustrato. Se añadieron 2ml de solución sustrato a cada cubeta y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Por último se detuvo el revelado de color lavando las tiras dos veces con 2 ml de agua destilada agitando durante al menos 3 minutos.

b. Lectura

- Una banda se consideró positiva si aparecía claramente una banda de color morado al final del ensayo.

-

c. Interpretación de Resultados

- Todas las bandas identificadas claramente fueron clasificadas utilizando la tarjeta de lectura de INNO-LiPA HPV Genotyping Extra. Los patrones se compararon con el diagrama de interpretación de INNO-LiPA Genotyping Extra suministrado con el estuche comercial.

Cuantificación y evaluación del estatus físico del genoma de VPH-16

La cuantificación del Virus de Papiloma Humano así como la evaluación de la integración del genoma se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando las especificaciones descritas por Koskinen y col. (2004).

La PCR en tiempo real fue realizada con 7500 Real Time PCR System (Applied Biosistem) en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Inmunología-UCV. La secuencia de los iniciadores se pueden observar en la tabla 6. La amplificación y cuantificación de los genes E6 y E2 se realizó simultáneamente en tubos de reacción separados. La mezcla de reacción consistió en 50µl conformada por 1X SSoFast Evagreen (BIORAD), 900nM de cada uno de los iniciadores, un aproximado de 50ng de ADN total. El proceso de amplificación constó de 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 44 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, anillamiento y extensión 60°C por 1 minuto, seguido de la curva de disociación.

En todas aquellas muestras que resultaron positivas para en VPH genotipo 16 se evaluaron para verificar la ruptura del gen E2 así como la cuantificación para los genes E2 y E6 del VPH genotipo 16.

Tabla 6.- Secuencias de los iniciadores empleados en la PCR en tiempo real para la cuantificación del genoma viral.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' 3'→
HPV-16 E2F primer	ACGACTATCCAGCGACCAAGAT
HPV-16 E2R primer	CCACTGAGTCTCTGTGCAACAAC
HPV-16 E6F primer	GCACAGAGCTGCAAACAACTATACA
HPV-16 E6R primer	TCCCGAAAAGCAAAGTCATATACC
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

La curva patrón se realizó con ADN de células HeLa, se emplearon los iniciadores GP5+/GP6+ que permiten detectar el genoma de VPH así como los iniciadores PC04 y GH20 para amplificar el gen de β globina humana (descritos en la tabla 6). El ADN extraído fue cuantificado (Beckman Instruments DV series Spectrophotometer.260-280nm). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de este material que fue empleado para las respectivas qRT-PCR. Para VPH se emplearon 1,5 μ M de cada iniciador (50 μ M), 1X SsoFast Eva Green en un volumen final de 20 μ l. Para la amplificación y cuantificación del gen β -globina se utilizaron 1 μ M de los iniciadores PC04 y GH20 (50 μ M), 2X SsoFast Evagreen para un volumen final de 50 μ l. El proceso de amplificación empleado fue 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C, una hibridación a 46°Cx 1 minuto y una extensión a 72 ° C durante 30 segundos.

Para conocer el estado del genoma de VPH al genoma celular se realizó el cálculo de radio E2/E6 siguiendo las especificaciones de Koskinen y col. (2004) valores iguales a cero

indicaban estado integrado, >0 pero <1 estado mixto y valores >1 implican un ADN viral de forma episomal.

Una vez realizado los procesos de amplificación tanto de la curva estándar como de la carga viral para los genes E6 y E2 se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,2 μ l de solución al 1%) y expuestos a luz UV para registro fotográfico en una cámara de visualización ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), corroborando que el proceso se ha llevado a cabo con éxito.

Detección del Virus de Epstein-Barr (VEB)

La detección del virus de Epstein-Barr se realizó mediante una PCR anidada (Nested-PCR) descrito por Arreaza y col. (2010) utilizado en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología- MPPS, empleando los iniciadores W1, W2, W3 y W4 mostrados en la tabla 7 con los que se obtiene un producto de 192 pb. Se incluyó, además, un control negativo (mezcla de reacción + agua destilada). En ambas rondas de amplificación del genoma de VEB la mezcla de PCR consistió 2,5 μ l de ADN en 25 μ l de solución que contenía 10 mmol/l tris-HCL (pH 8.3) (Invitrogen), 50 mmol/l KCL (Invotrogen), 1,2 mmol/l $MgCl_2$ (Invotrogen), 200 μ mol/l de cada dNTP (Invotrogen), 20 pmol del respectivo iniciador (Invotrogen), 1,25U de Taq polimerasa (Invotrogen) y agua. Con el iniciador externo, se realizaron 30 ciclos de amplificación: 92°C por 45 segundos, 66°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos (Mastercycler® ep, Eppendorf). Del material amplificado, se usó 2,5 μ l para amplificar el ADN con el iniciador interno, aplicando 40 ciclos. Los resultados de la amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, en buffer TBE 1X

(Invotrogen). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,2 µl de solución al 1%) y expuestos a luz UV (ChemiDOC™ XRS+. BIORAD, USA) para registro fotográfico.

Tabla 7.- Secuencias de los iniciadores para la detección del virus de Epstein-Barr

Nombre del iniciador	Secuencia	Ronda de Amplificación
W1	5'CTA GGG GAG AAC GTG AA 3'	Primera
W2	5' CTG AAG GTG AAC CGC TTA CCA 3'	Primea
W3	5' GGT ATC GGG CCA GAG GTA AGT 3'	Segunda
W4	5' GCT GGA CGA GGA CCC TTC TAC 3'	Segunda

Ensayos Inmunohistoquímicos

Soluciones Buffer o Tampones

Buffer fosfato salino o tampones (PBS):

Solución madre NaCl 180gr, Na₂PO₄ 33gr, K₂HPO₄ 188 gr.

Solución de trabajo (1Lit): 40 ml de solución madre, 960 ml de agua destilada

Solución buffer acetato 0,1 M pH 5,3 (1Lit)

Acetato de sodio x 3H₂O 0,1 M (13,61 gr/lit) 790 ml.

Ácido acético 0,1 M (5,75 ml/lit) 210 ml.

Hematoxilina de Meyers

1 gr de hematoxilina; 1 lit de agua destilada, 0,2 gr de lodato de Na, 50 gr de Amonio o potasio de aluminio, 1 gr de ácido cítrico monohidratado; 50 gr de hidrato de cloral.

Anticuerpos Primarios

Se usaron anticuerpos primarios monoclonales específicos para detectar las oncoproteínas P53, Bcl-2; marcadores de proliferación celular Ki-67, PCNA y EGFR como marcador de transducción de señales.

Tabla 8.- Anticuerpos primarios y concentración empleadas

Anticuerpo	Casa Comercial		Dilución
P53	INVITROGEN	Mouse/anti-human	1:100
PCNA	INVITROGEN	Mouse/anti-human	1:100
Ki-67	INVITROGEN	Mouse/anti-human	1:100
Bcl-2	INVITROGEN	Mouse/anti-human	1:100
EGFR	INVITROGEN		1:100

Descripción de la técnica

Para realizar el estudio inmunohistoquímico, los cortes fueron desparafinados y rehidratados siguiendo los procedimientos histológicos habituales, se realizó exposición del antígeno con Buffer citrato, luego se bloqueó la peroxidasa endógena utilizando peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂ al 3%) en metanol (estuche DAB. Invitrogen).

Las secciones se incubaron durante una hora con los anticuerpos primarios monoclonales dirigidos contra P53, Bcl-2, PCNA, Ki-67 y EGFR. La dilución empleada fue 1:100 para cada uno.

Se realizaron incubaciones con un anticuerpo secundario Biotinilado (Invitrogen) seguido de incubaciones con el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) (Vectastain) y se reveló (3-Amino-9-etil Carbazole) AEC (SIGMA).

Las secciones serán finalmente coloreadas con hematoxilina de Meyer y diferenciadas con agua corriente.

Montaje de las láminas

Las secciones coloreadas fueron cubiertas con medio de montaje Inmu-mount (Shandon) y se le colocó un cubre objetos de 20x50 dejándose secar para su posterior observación a microscopio y registro.

Por último se evaluaron los tejidos empleando una escala de una a tres cruces (+) para marcaje positivo y negativo (-) para los tejidos no marcados. El número de cruces simboliza la intensidad (I) como la extensión (E) en el campo del tejido observado.

Esta simbología se empleó de la siguiente manera para la extensión (E):

+ : Escasas células marcadas.

++ : Más o menos el 50% de células marcadas.

+++ : Más del 50 % de las células marcadas.

Con respecto a la intensidad del marcaje (I), se aplicó la simbología de cruces de la siguiente manera:

+ : Células débilmente marcadas.

++ : Células moderadamente marcadas.

+++ : Células fuertemente marcadas.

Análisis estadísticos

La relación entre las infecciones virales y los marcadores tumorales con el desarrollo de los tumores, se evaluó mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2), la significancia estadística fue considerada para valores de $p < 0,05$

Para los análisis y estimación de las curvas de supervivencia de los pacientes se empleó el método de Kaplan Meier. La significancia estadística fue considerada para valores de $p < 0,05$.

Para ambos casos se utilizó el programa estadístico SPSS V.2.0

Resultados

Tabla 9.- Características generales de la muestra de estudio

Característica de la muestra	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
Género		
Femenino	31,25	0,001
Masculino	68,75	
Hábito tabáquico		
Fumador	73,80	0,000
Actual	70	
Antiguo	30	
No fumador	26,2	
Hábito de consumo de alcohol		
Consumidor de alcohol	70	0,000
Consumidor Antiguo	0	
Consumidor Actual	100	
No consumidor de alcohol	30	
Localización del tumor primario		
<u>Cavidad oral</u>	33,8	
Lengua	56	
Reborde Alveolar	15	
Piso de la Boca	15	
Labio	7	
Paladar duro	4	
Mucosa yugal	4	
<u>Laringe</u>	30	0,000
Glottis	58	
Supraglottis	42	
<u>Orofaringe</u>	22,50	
Amígdala	72	
Paladar duro	22	
Base de la lengua	6	
Seno paranasal	5	
Nasofaringe	3,80	
Hipofaringe	2,50	
Fosa nasal	2,50	

El promedio de edad de los 80 pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello estuvo ubicado en $60,34 \pm 14,48$ años (rango 19-89). En la tabla 11 se muestran las características generales de los mismos, en ella se puede notar que la población estuvo constituida mayoritariamente de pacientes pertenecientes al género masculino con un 68,75% (55/80), mientras que los pacientes pertenecientes al género femenino solo alcanzan el 31,25% (25/80) de dicha población. El hábito de fumar se observó en 73,80% (58/80) y el consumo de alcohol en 70% (56/80). Con respecto al grupo de pacientes sanos se observó que, el promedio de edad fue de $22 \pm 4,14$ años (rango 16-33), con predominancia del género femenino (55%), alto porcentaje de los pacientes eran consumidores de alcohol (90%) mientras que el consumo de tabaco se observó solo en el 10% de los pacientes (Anexo 1).

En cuanto a la localización anatómica del tumor, los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de la Cavidad Oral encabezan la lista con 33,8% (27/80), seguido de los pacientes con carcinoma de células escamosas de laringe en 30% (24/80), pacientes CCE de orofaringe 22,50% (18/80), CCE de senos paranasales (5% (4/80), CCE de Nasofaringe 3,8% (3/80), y por último CCE de hipofaringe y nasofaringe 2,5% cada uno (2/80).

Tabla 10.- Estadíaje TNM de la muestra en estudio

Tamaño del tumor	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
T1	8,80	
T2	21,30	
T3	30	
T4	40	
Grado del tumor		
G1	21,25	0,03
G2	45	
G3	36,25	
Estadio del tumor		
EI	6,30	0,000
EII	12,50	
EIII	27,50	
EIVa	35	
EIVb	18,80	

En la tabla 10, se pueden observar las características histológicas de los tumores analizados, donde se muestra que 30% (24/80) de los tumores se encontraban en tamaños pequeños como T1 y T2, mientras que 70% (56/80) se encontraban en tamaños T3 y T4. Al observar los estadios tumorales se puede notar que la mayoría se encontraba en estadios avanzados de la enfermedad (estadios III y IV). 21,5% (17/80) corresponde a tumores bien diferenciados (G1), 45% (36/80) a tumores moderadamente diferenciados (G2) y el 36,25% (26/80) corresponde a tumores escasamente diferenciados (G3)

Detección de las Infecciones Virales

Tabla 11.- Detección y tipificación de VPH en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCEC)

Detección de VPH	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
Positivo	66	0,004
Negativo	34	
Genotipos de VPH		
16	17	0,000
6,11 y 16	17	
6	11	
6,51	9,4	
6,11,16,31	5,6	
6,16,18,31	3,7	
6,11	3,7	
31	3,7	
35	3,7	
51	3,7	
6,31	1,8	
11 y 16	1,8	
53	1,8	
11,16 y 51	1,8	
16 y 18	1,8	
16,18 y 31	1,8	
35 y 51	1,8	
6 y 16	1,8	
6,11,16 y 18	1,8	
6,11,16 y 53	1,8	

En la tabla 11 se muestran los resultados de la detección y tipificación de VPH en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (CCECC). El 66% (53/80) de las muestras resultó positiva para la presencia del genoma de VPH; de estos el genotipo más frecuente en forma de infección única es el VPH-16, el cual estuvo presente en el 17% (9/53), si observamos detenidamente, se puede ver que la infección por este genotipo en conjunto con otros genotipos de alto riesgo oncogénico (genotipo 18, 31, 33, 51, 53) estuvo presente en el 3,6% (2/53), mientras que la infección de VPH-16 con genotipos de alto y bajo riesgo se observó en el 31,7% (16/53), sumando un 52,3% de los casos con CCECC evaluados que presenta el genoma de VPH tipo16.

En el grupo de pacientes sanos la detección de VPH fue considerablemente menor con un 30% (6/20) de pacientes infectados, siendo los genotipos 6 y 51 en forma de infección mixta los predominantes con 83% (5/6) (Anexo 1).

Distribución de la infección por VPH en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del tumor

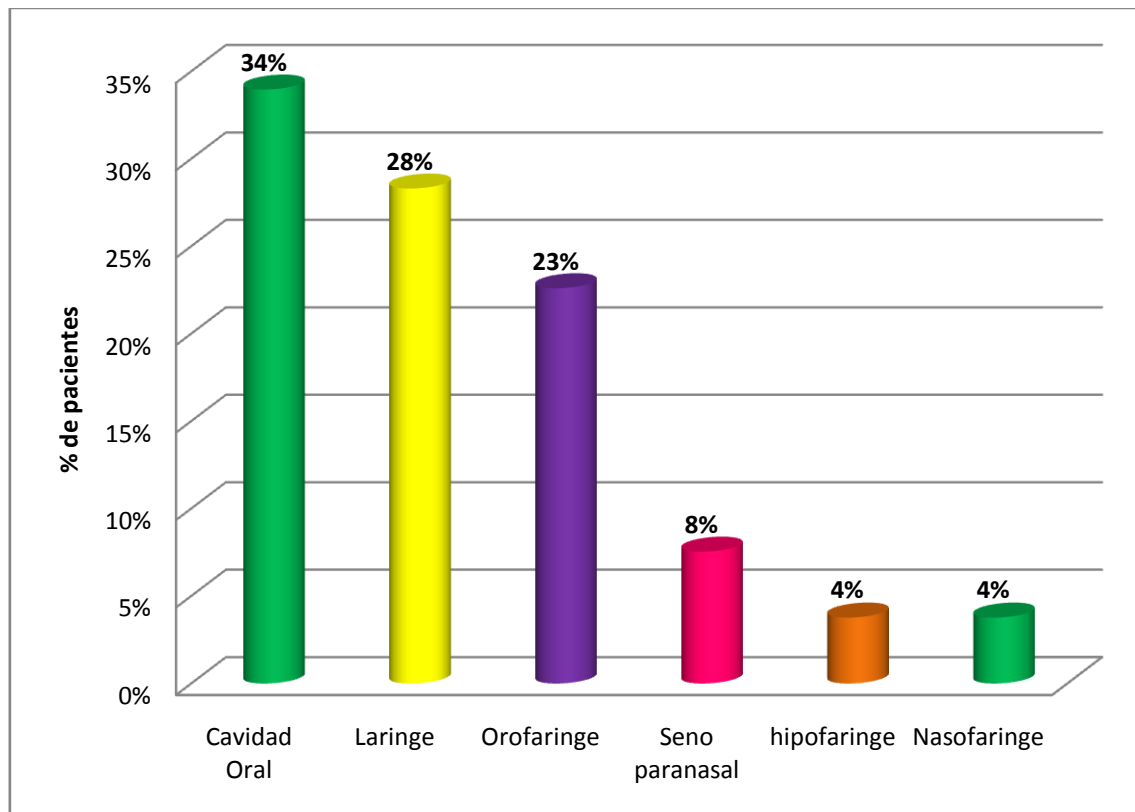


Figura 18- Distribución de la infección por VPH en pacientes con CCECC según la localización anatómica del tumor

Como puede apreciarse en la figura 18, la cavidad oral fue la localización anatómica que presentó una mayor tasa de infección por VPH, con 34% (18/53) seguido de la laringe con 28% (15/53) y la orofaringe con 23% (12/53), el resto de las localizaciones anatómicas como los senos paranasales, hipofaringe y nasofaringe la infección viral fue detectada en menor proporción (8%(4/53) ,4% (2/53) y 4% (2/53) respectivamente ($p=0,606$).

Distribución de la infección por VPH en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según el estadio tumoral

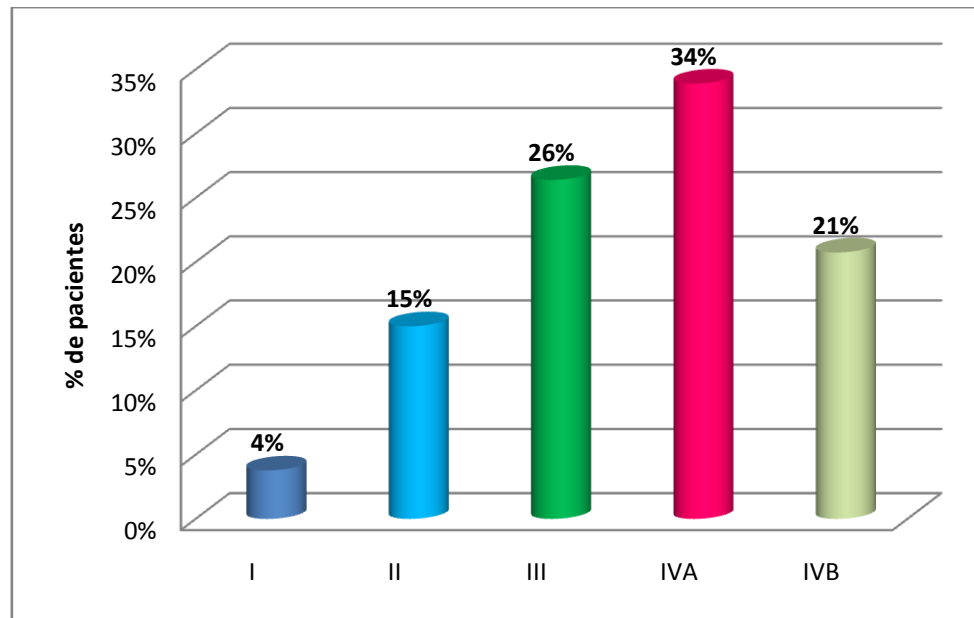


Figura 19.- Distribución de la infección por Virus Papiloma Humano en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (CCECC) según el estadio tumoral.

En la figura 19, se presentan la positividad para la infección por VPH según el estadio tumoral, se puede observar que los estadios avanzados de la enfermedad son los que poseen una mayor tasa de positividad para la infección viral (estadios III con 26% (14/53) y IV con 34% (29/53)), mientras que los estadios tempranos presentan porcentajes de infección bastante bajos (4% (2/53) en estadio I y 15% (8/53) en estadio II) ($p=0,312$).

Tabla 12.- Infección por Virus Epstein-Barr en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello Según la Localización Anatómica y Estadío del Tumor

Infección por Virus Epstein-Barr	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
- Positivo	51,25	0,823
- Negativo	48,75	
Localización anatómica el tumor		
- Cavidad Oral	39	0,158
- Laringe	34	
- Orofaringe	24	
- Nasofaringe	2,4	
Estadio Tumoral		
- I	2	0,209
- II	15	
- III	34	
- IV	49	

En la tabla 12, se muestran los resultados de la detección de la infección por VEB en pacientes con CCECC, como puede apreciarse el 51,2% (41/80) resultó positivo para la infección por este agente viral, la localización anatómica del tumor primario con mayor frecuencia de infección fue la cavidad oral con 39% (16/41) seguido de la laringe, la orofaringe y la nasofaringe (34% (14/41), 24% (10/41) y 2,4% (1/41) respectivamente) el resto de las localizaciones anatómicas no presentó infección por VEB. La presencia del genoma de VEB fue más frecuente en los tumores que se encontraban en estadio avanzado de la enfermedad, estadio IV (49%; (20/41)), mientras que aquellos estadios tempranos la frecuencia de infección es relativamente baja (2% en Estadio I y 15% en estadio II). Para el grupo de pacientes sanos no se detectaron casos positivos para la infección por este virus (tabla anexo 1).

**Evaluación de la expresión de Marcadores Moleculares en pacientes con Carcinoma de
Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

Tabla 13.- Expresión de los marcadores moleculares en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

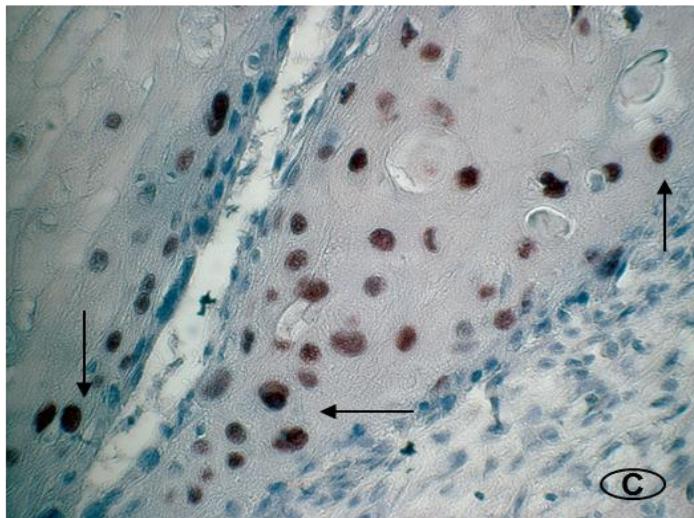
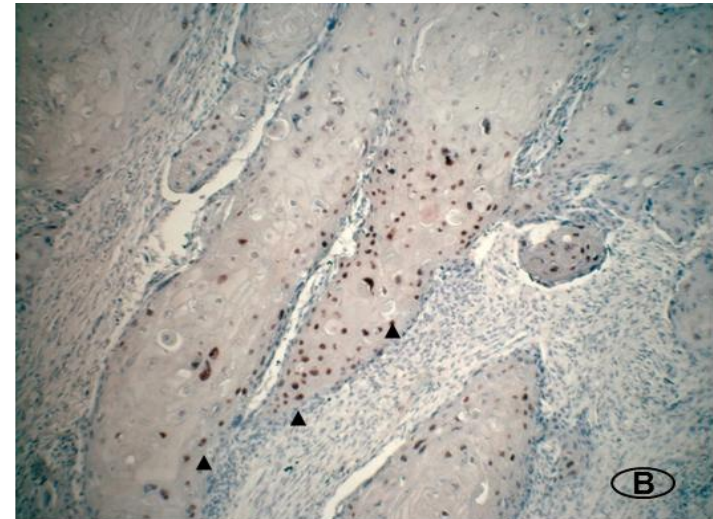
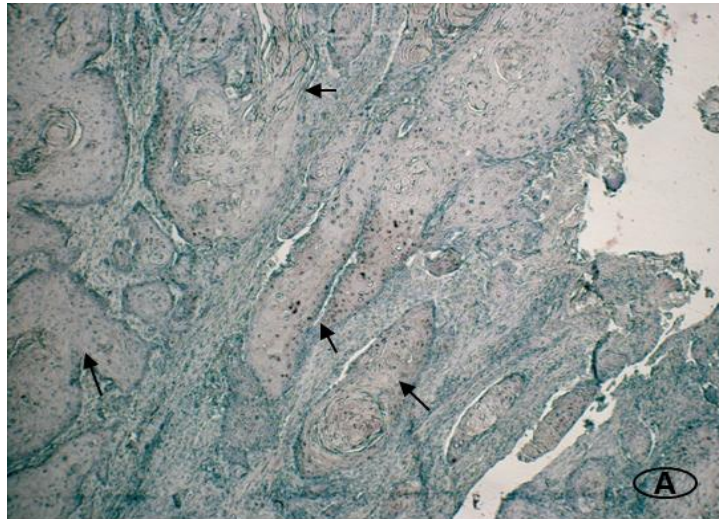
Marcador Molecular	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
P53		
- Positivo	41,3	0,074
- Negativo	58,7	
PCNA		
- Positivo	72,5	0,000
- Negativo	28,75	
Ki-67		
- Positivo	17,5	0,000
- Negativo	82,5	
Bcl-2		
- Positivo	33,8	0,004
- Negativo	66,2	
EGFR		
- Positivo	46,3	0,502
- Negativo	53,7	

En la tabla 13, se muestran los resultados de inmunopositividad para cada uno de los marcadores tumorales evaluados, PCNA fue el que presentó mayor inmunopositividad con un 72% (57/80) de casos positivos, seguido de EGFR con 46,3% (37/80), P53 con 41,3% (33/80) y Bcl-2 con 33,8% (27/80), mientras que Ki-67 fue el que presentó menor inmunopositividad con un 17,5% (14/80) de casos positivos.

En el caso de los pacientes sanos, no se observó positividad para ninguno de los marcadores moleculares analizados (Tabla Anexo 1).

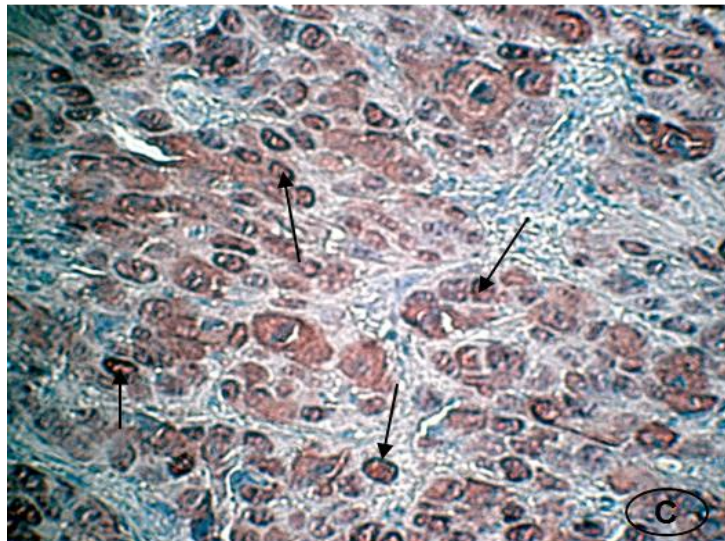
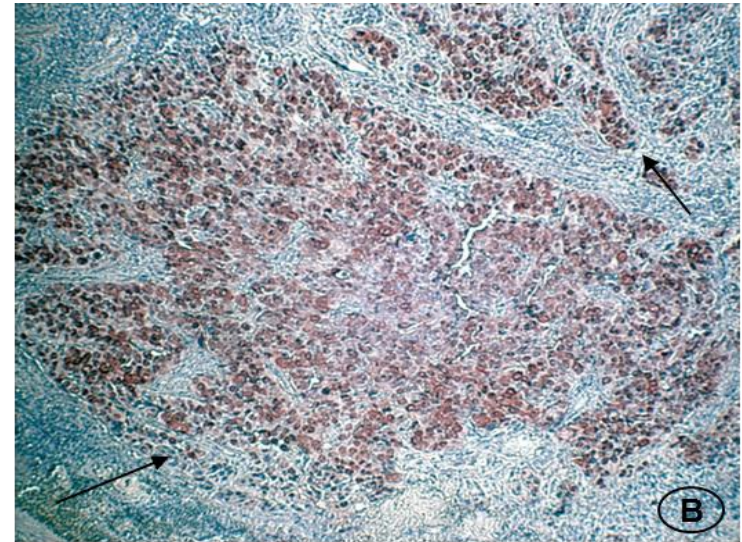
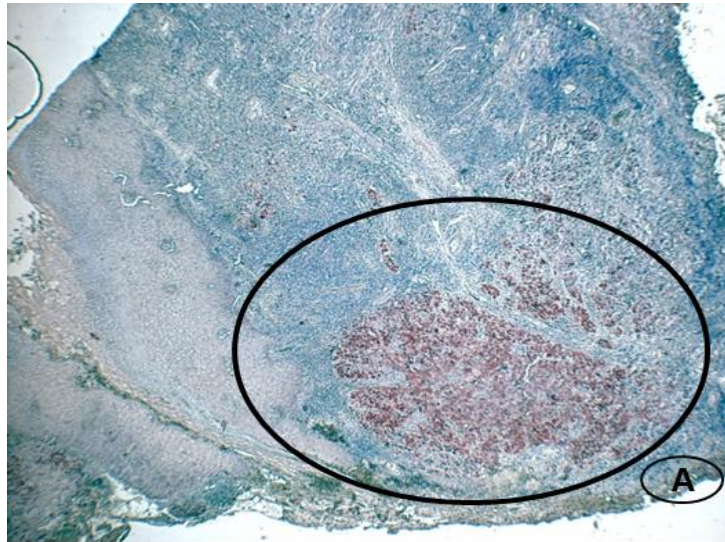
**Expresión del marcador molecular P53 en tumores de pacientes con Carcinoma
de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

Figura 20.- Inmunomarcaje para P53 en tumor de la cavidad oral



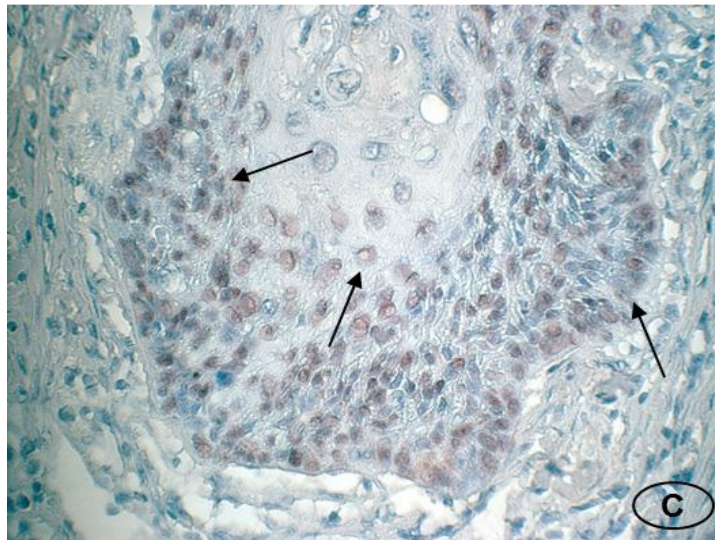
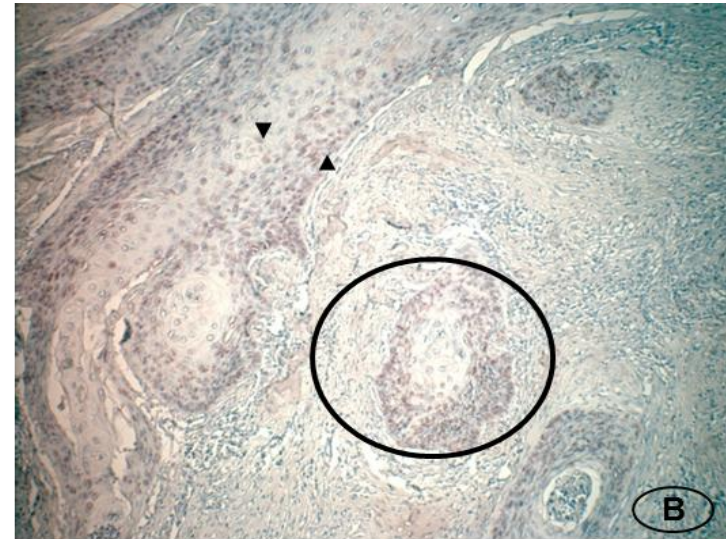
En estas imágenes se pueden observar unas micrografías que corresponden a un tejido de la cavidad oral, al cual se le realizó inmunohistoquímica contra p53 (Supresor tumoral), utilizando un anticuerpo primario monoclonal en una dilución 1:100. En la Fig A, (aumento 4X) se pueden apreciar áreas con una organización que asemejan una masa celular que corresponden al tumor (flechas) y regiones de células sanas, en la fig. B, se pueden notar el mismo tejido a un aumento de 10X donde se señalan (cabeza de flechas) en un área de tumor algunas células teñidas de color rojo, lo que indica su positividad para p53. En la Fig. C, se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala con flechas algunos núcleos de color rojo que muestran positividad para p53 y algunos núcleos coloreados en azul que corresponden a regiones sanas del tejido sin ningún marcaje.

Figura 21.- Inmunomarcaje para P53 en tumor de Orofaringe



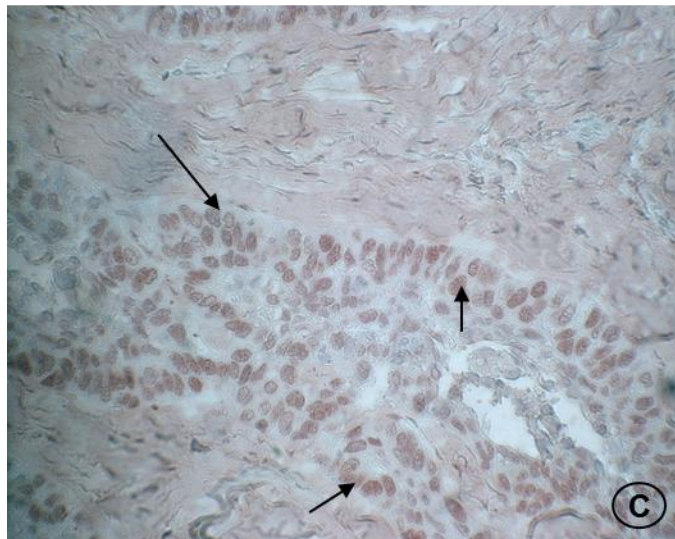
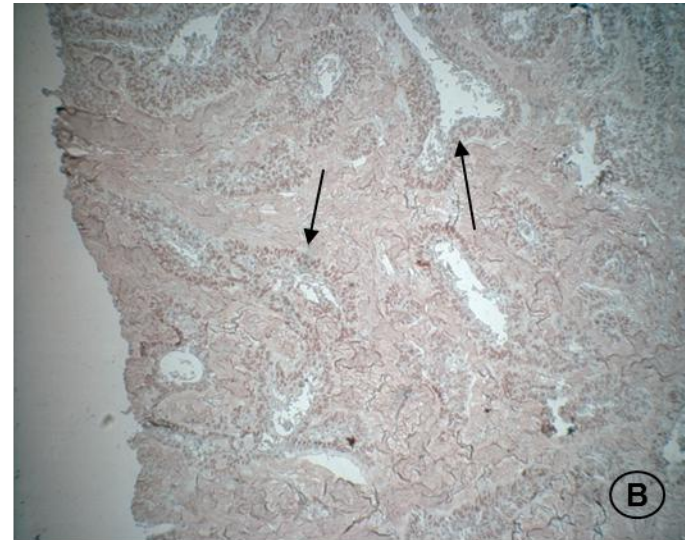
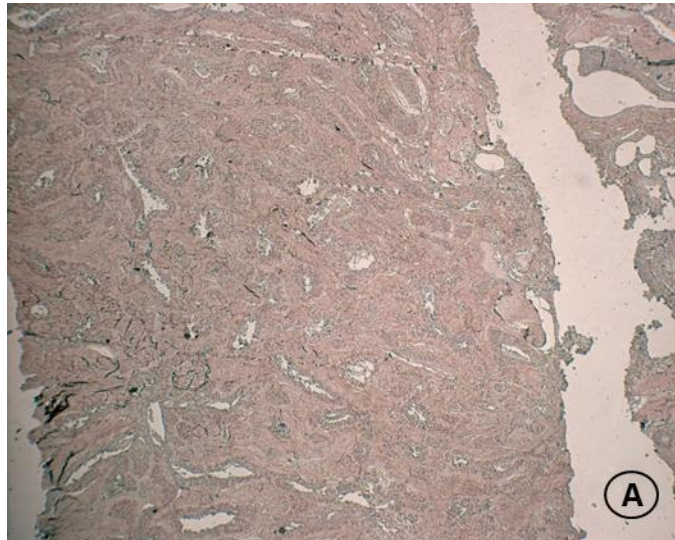
En estas imágenes se pueden observar unas micrografías que corresponden a un tejido de Orofaringe al cual se le realizó inmunohistoquímica contra p53 (Supresor Tumoral), utilizando para ello un anticuerpo primario monoclonal con una dilución 1:100, el tejido de esta mucosa se nota ulcerado perdiéndose parte del epitelio; el tejido se notó desordenado con lengüetas del tumor en el epitelio restante que es lo que se conoce como infiltración. En la fig A, (4X) se puede apreciar un área (encerrada en círculo) que es la región que contiene células tumorales y regiones que contienen células sanas. En la fig. B se puede notar el mismo tejido a un aumento de 10X donde se señala con flechas en el área coloreada de rojo las células positivas para p53. En la Fig. C se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala igualmente con flechas algunos núcleos de color rojo que reflejan la positividad para p53 e también se pueden discriminar células teñidas de color azul que corresponden a regiones sanas del tejido

Figura 22.- Inmunomarcaje para P53 en tumor de Laringe



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes a la laringe a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra p53, utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. El tejido en sí corresponde a un carcinoma epidermoide algo diferenciado, queratinizado en algunas regiones del tumor, con infiltraciones del epitelio unidas al tumor. En la fig A.. (4X) se puede observar (Señalados por flechas) regiones las "lengüetas" o las regiones infiltradas teñidas de color rojo, Cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) en la fig B, donde se señala con la cabeza de flechas en una de las lengüetas algunas células teñidas de color rojo lo que indican positividad y encerrado en círculo se delimita la región ampliada en la Fig C. donde se observa (flechas) algunos núcleos de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-p53, y algunas células teñidas de color azul que corresponden a regiones sanas del tejido sin marcaje

Figura 23.- Inmunomarcaje para P53 en tumor de Senos Paranasales



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes la seno paranasal a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra p53 (proteína supresora de tumores), utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. El tejido en sí corresponde a un carcinoma epidermoide algo collagenizado, con infiltraciones. En la fig A. (4X) se pueden observar una región de color rojo que son áreas pertenecientes al tumor, cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) en la fig B, se puede observar señalado con flechas algunas lengüetas con células teñidas de color rojo lo que indican positividad y un mayor detalle del área del tumor, en la Fig C. se observan (flechas) algunos núcleos de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-p53.

**Expresión de P53 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello
según la localización anatómica del Tumor**

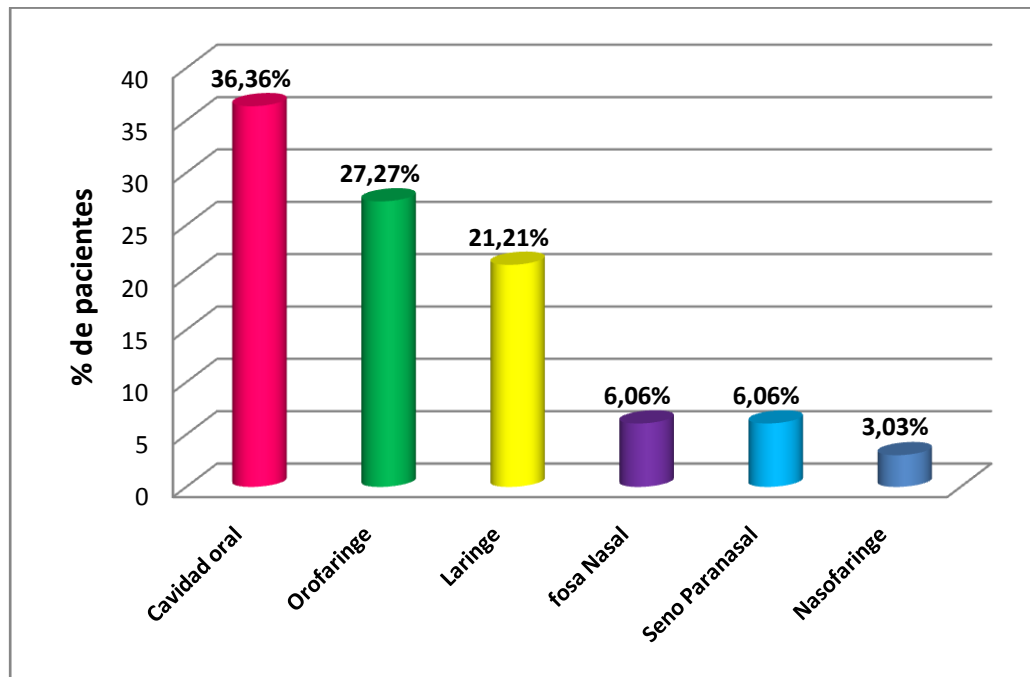


Figura 24.-Expresión de P53 en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la localización anatómica del tumor.

La figura 24, muestra la expresión de P53 según la localización anatómica del tumor, como puede observarse, la cavidad oral es la localización anatómica que presenta una mayor inmunopositividad (36,36% (12/33)) seguido por la orofaringe y la laringe (27,27% (9/33) y 21,21% (7/33) respectivamente) mientras que en las fosas nasales y los senos paranasales la inmunopositividad fue de 6,06% (2/33) para cada una, siendo la nasofaringe la localización con menor expresión del marcador (3,03% (1/33)) ($p=0,273$).

Extensión del inmunomarcaje para P53 en pacientes con Carcinoma de Células

Escamosas de Cabeza y Cuello

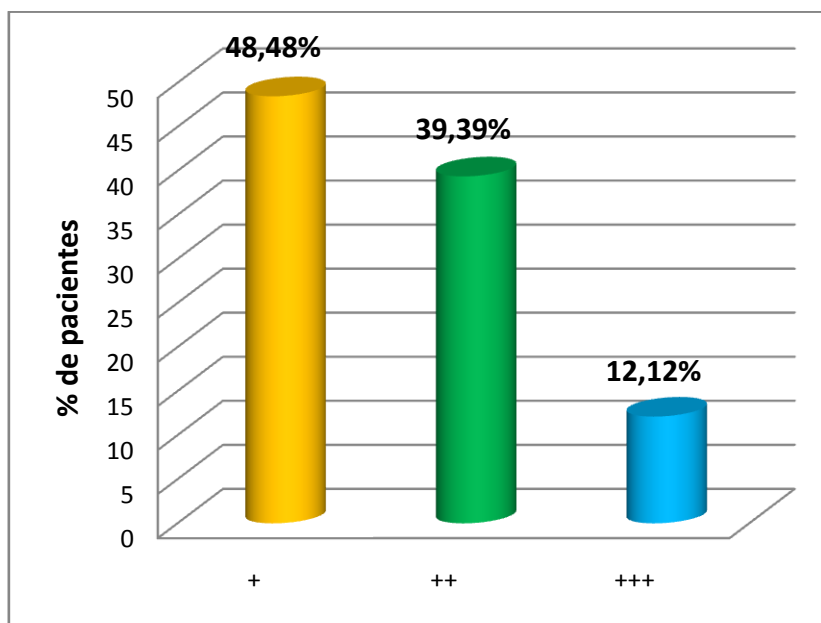


Figura 25.- Extensión del inmunomarcaje para P53 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

En la figura 25, se muestran los resultados de la extensión del marcaje para P53 en pacientes con CCECC, aquellos tejidos tumorales que presentaron escasas células marcadas ocupan la posición predominante con 48,48%,(16/33) mientras que aquellos en los que había un marcaje en más del 50% del tejido solo ocupó el 12,12% (4/33) de los casos evaluados.

Intensidad del inmunomarcaje para P53 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

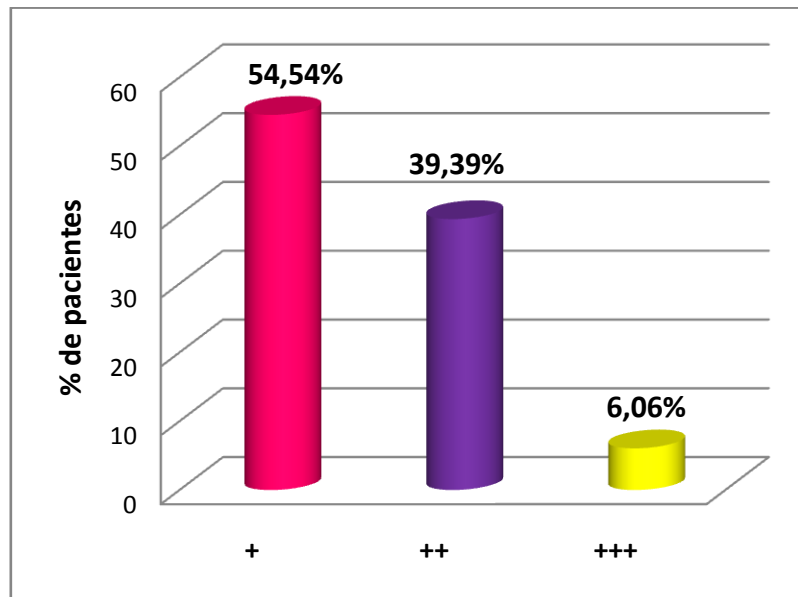


Figura 26.- Intensidad el inmunomarcaje para P53 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

La figura 26 corresponde a la intensidad del marcaje para P53 en tumores de pacientes con CCECC, en ella se puede apreciar que la mayoría de los núcleos celulares presentaban un marcaje débil (54,54% (18/33)) mientras que una escasa parte de la muestra presentó células fuertemente marcadas (6,06% (2/33)). EL 39,39% (13/33) de los tumores evaluados presentó un marcaje moderado (++)

**Expresión de P53 y su relación con la persistencia de la enfermedad en pacientes con
Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

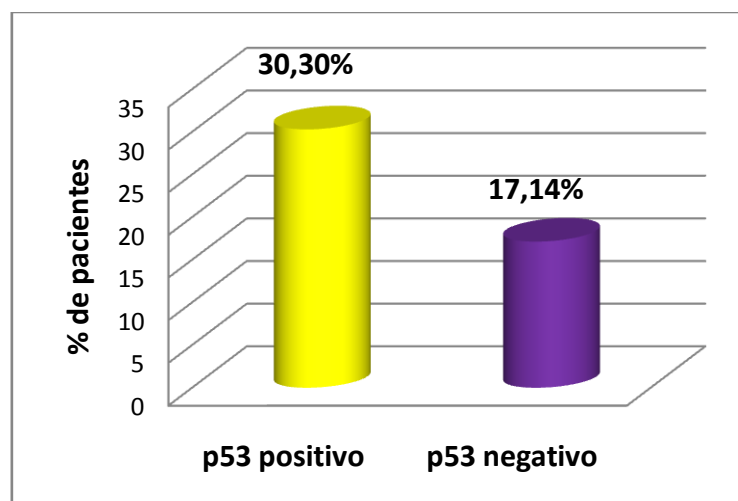


Figura 27.- Expresión de P53 y su relación con la persistencia de la enfermedad

En la figura 27 se representa esquemáticamente la relación entre la persistencia de la enfermedad y la inmunopositividad para P53, en ella se puede notar que los casos que presentaron inmunomarcaje para P53 son los de mayor persistencia de la enfermedad (30,30% (10/33)) mientras que en los casos P53 negativos la persistencia es menor (17,14% (8/47)) (p=0,173).

Relación de la expresión de P53 con el estatus actual de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

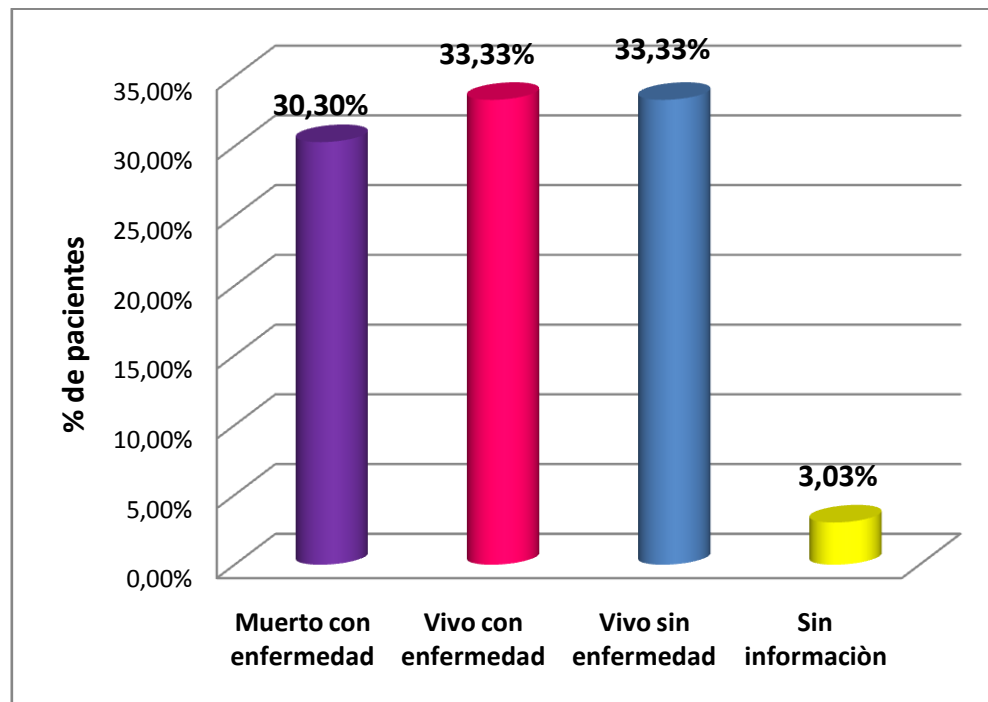
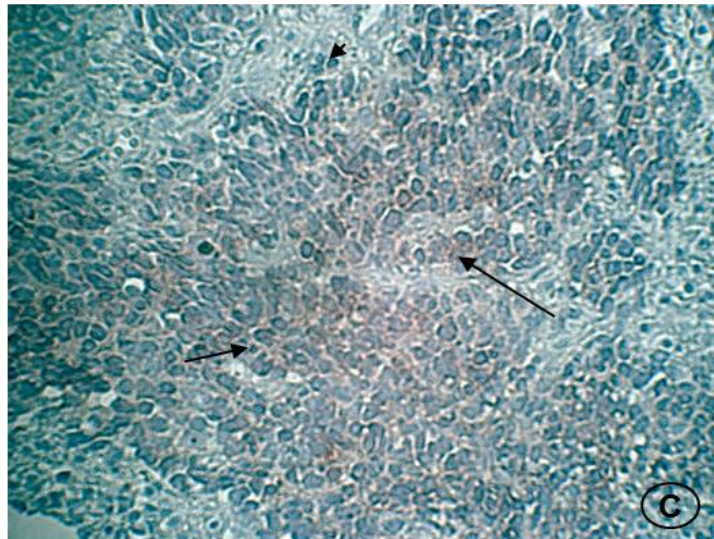
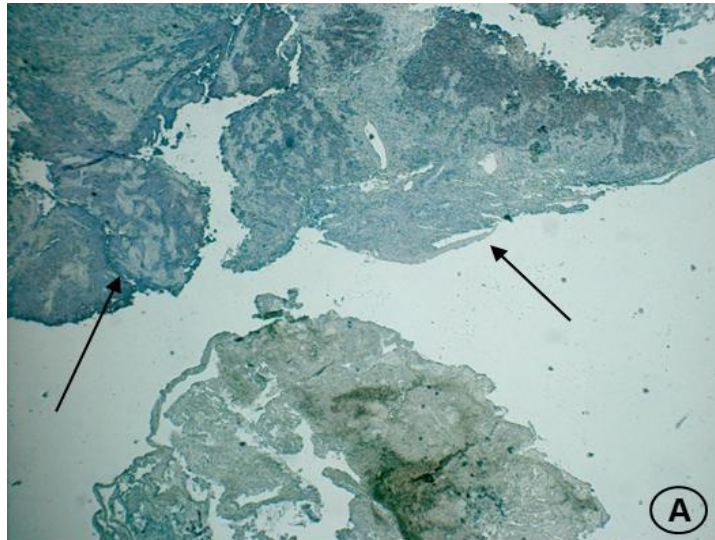


Figura 28.- Relación entre la expresión de P53 con el estatus de los pacientes

En la figura 28 se pueden observar la relación entre la inmunopositividad para P53 con el estatus de los pacientes. Aquellos pacientes que resultaron positivos para P53 y que aún permanecen con vida y con enfermedad ocupan el 33,33% (11/33), de igual manera los pacientes que hasta el momento de la última entrevista permanecían sanos ocupan el 33,33% (11/33) de los casos evaluados, mientras que un porcentaje de 30,30% (10/33) de los casos P53 positivos fallecieron a causa de la malignidad. Del 3,03% (1/33) de los casos no se tienen reportes ya que no se pudo realizar el seguimiento de los pacientes, ya sea porque no asistieron más a la consulta o cambiaron de centro médico ($p=0,405$).

**Expresión de Bcl-2 en tumores de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas
de Cabeza y Cuello**

Figura 29.- Inmunomarcaje para Bcl-2 en tumor de Orofaringe



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes a la orofaringe a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra Bcl-2 (proteína anti apoptótica), utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. El tejido en sí corresponde a un carcinoma epidermoide algo diferenciado, con infiltraciones del epitelio unidas al tumor. En la fig A. (4X) se pueden observar (Señalados por flechas) regiones teñidas de color rojo que son áreas pertenecientes al tumor, cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) en la fig B, se puede observar señalado con flechas algunas células teñidas de color rojo lo que indican positividad, en la Fig C. se observa (flechas) algunos citoplasmas de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-Bcl-2, y algunas células teñidas de color azul que corresponden a regiones sanas del tejido sin marcaje (cabeza de flechas)

Expresión de Bcl-2 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del tumor

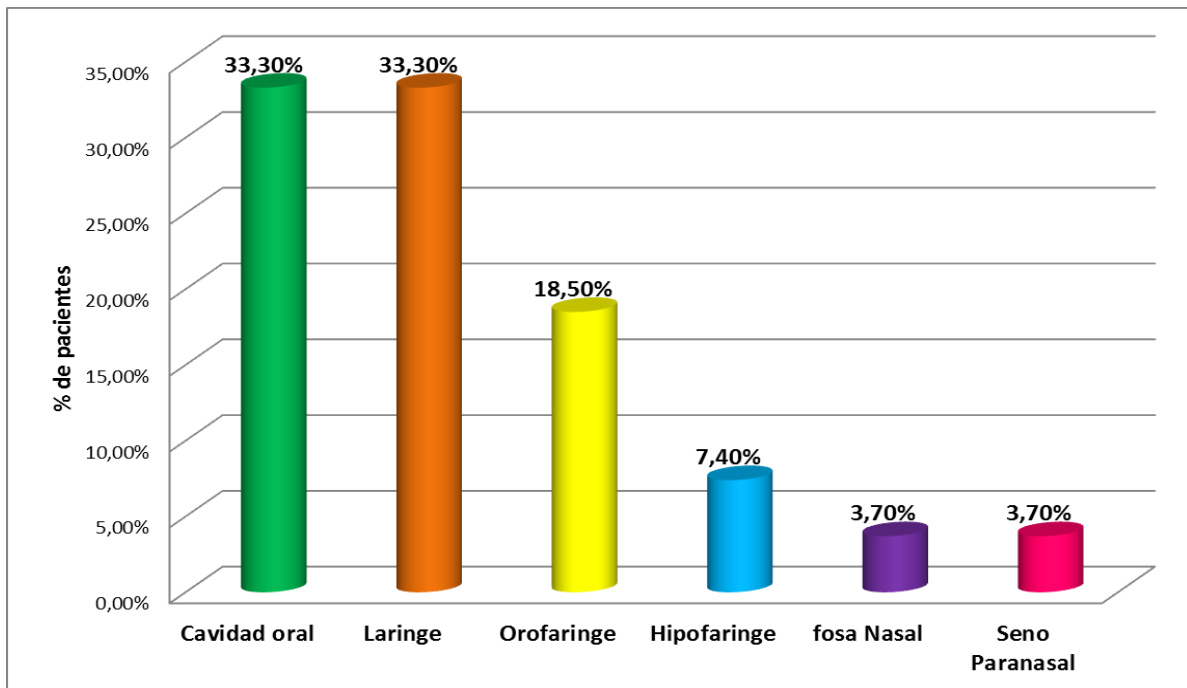


Figura 30.- Expresión de Bcl-2 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del tumor

La figura 30 muestra los resultados de la positividad para Bcl-2 en tumores de pacientes con CCECC, como puede observarse la cavidad oral y la laringe fueron las localizaciones tumorales con mayor positividad para dicho marcador (33,3%(9/27) cada una, seguido de la orofaringe (18,5% (5/27)) cuya tasa de positividad es de aproximadamente la mitad que estas, la hipofaringe, fosas nasales y senos paranasales presentaron una inmunopositividad menos frecuente (7,4% (2/27), 3,70% (1/27) y 3,70% (1/27) respectivamente) ($p=0,806$).

Intensidad de inmunomarcaje para Bcl-2 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

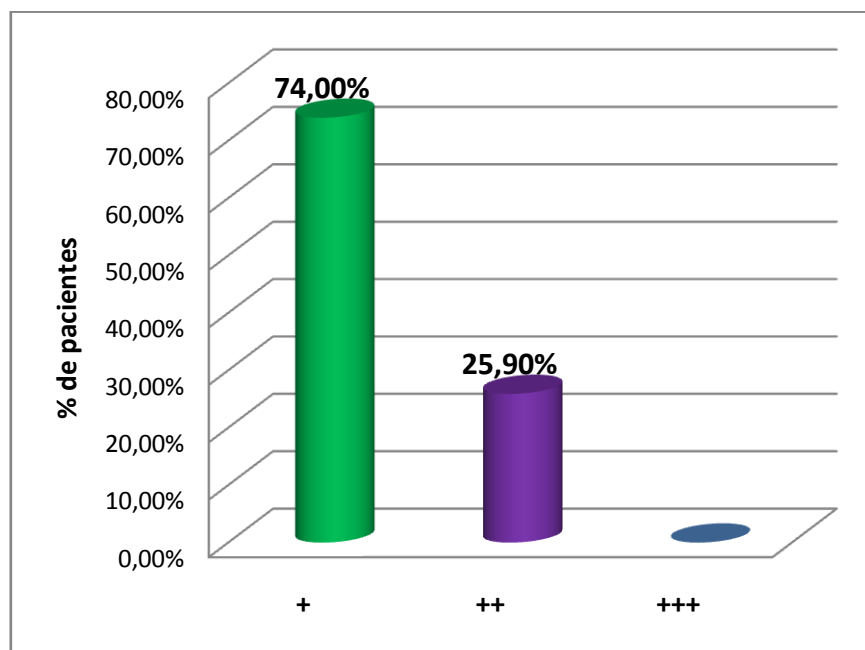


Figura 31.- Intensidad del marcaje para Bcl-2 en pacientes con CCECC

En la figura 31 se muestran las frecuencias de la intensidad de la inmunotinción para Bcl-2 en muestras de tumores de pacientes con CCECC, en ella se puede observar que el 74% de los pacientes positivos para dicho marcador presentaban una baja intensidad en el marcaje de las células, mientras que en el 25,9% el marcaje observado fue moderado (++). No se observaron tejidos con alta intensidad del marcaje.

Extensión del inmunomarcaje para Bcl-2 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

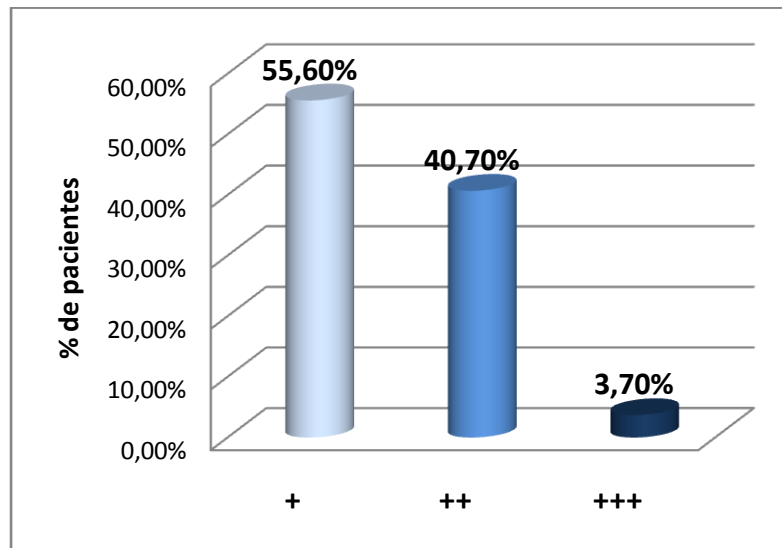


Figura 32.- Extensión del marcate para Bcl-2 en pacientes con CCECC

La extensión del marcate para Bcl-2 es mostrada en la figura 32, como puede verse la mayoría de los tejidos evaluados presentaron poca extensión, de una cruz (+), con 55,6% (15/27); el 44,7% (11/27) presentó una inmunotinción de dos cruces (++) y solamente una pequeña porción de la muestra, que representó al 3,7% (1/27) presentó una extensión de tres cruces (+++)

**Relación entre la inmunopositividad para Bcl-2 y la persistencia de la enfermedad
en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

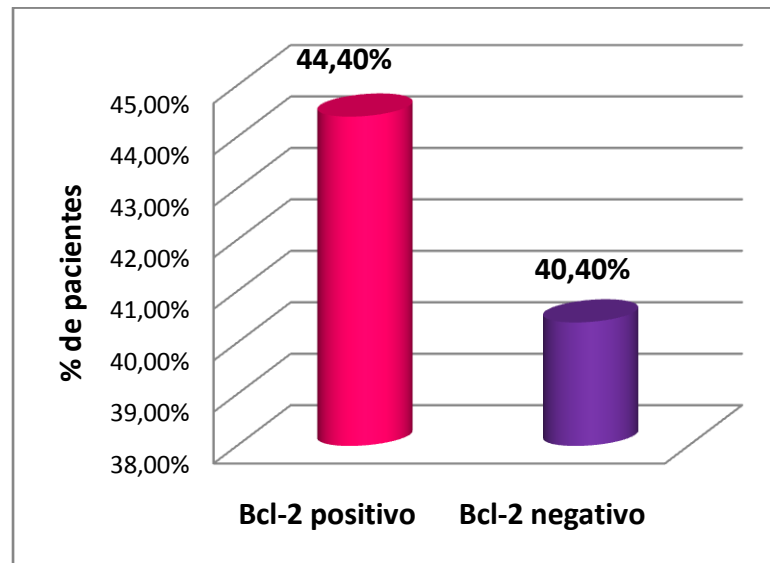


Figura 33.- Relación entre la expresión de Bcl-2 y la persistencia de la enfermedad

La relación entre la persistencia de la enfermedad y la expresión de Bcl-2 es mostrado en la figura 33, como puede notarse la persistencia de la enfermedad se observó en el 44,4% (12/27) de los pacientes evaluados que presentaban inmunopositividad para Bcl-2, mientras que en los pacientes Bcl-2 negativos la persistencia se observó en el 40,4% (21/53) ($p=0,839$).

**Relación entre la positividad para Bcl-2 y el estatus actual de los pacientes con
Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

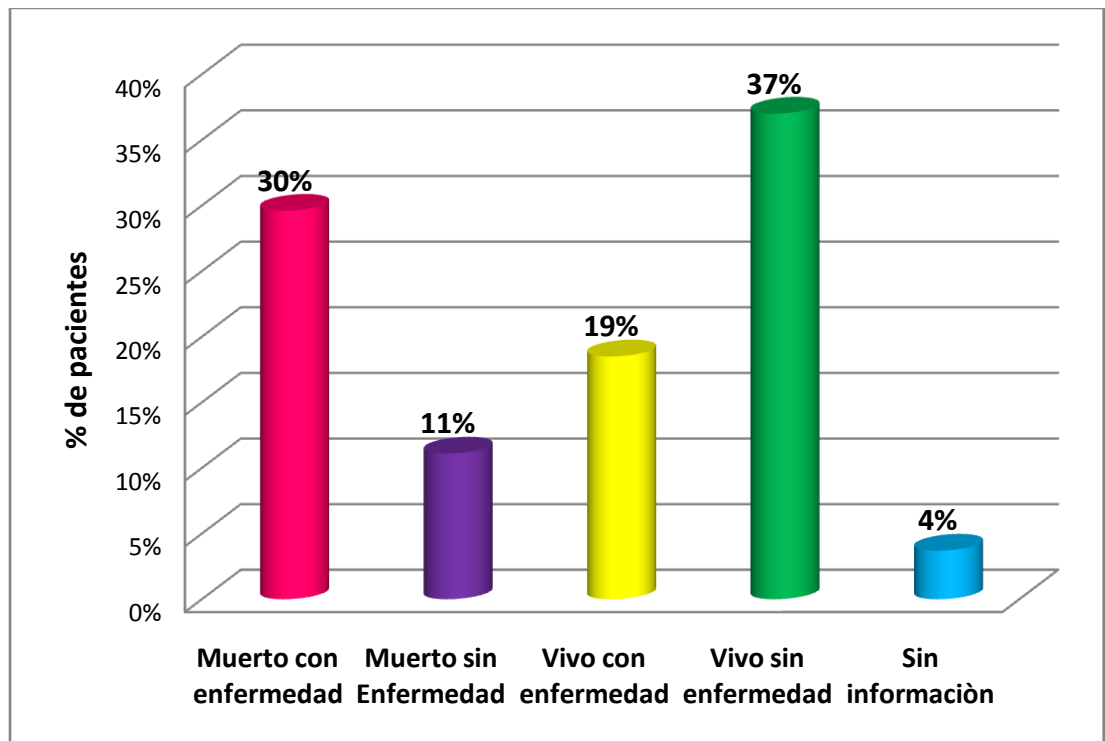
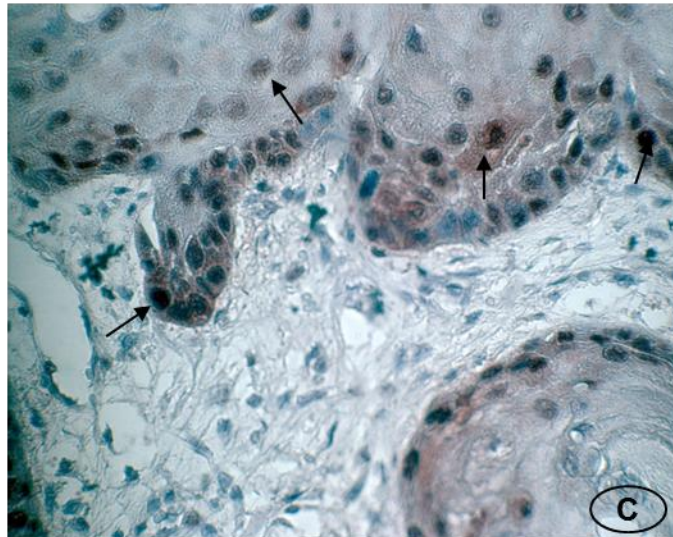
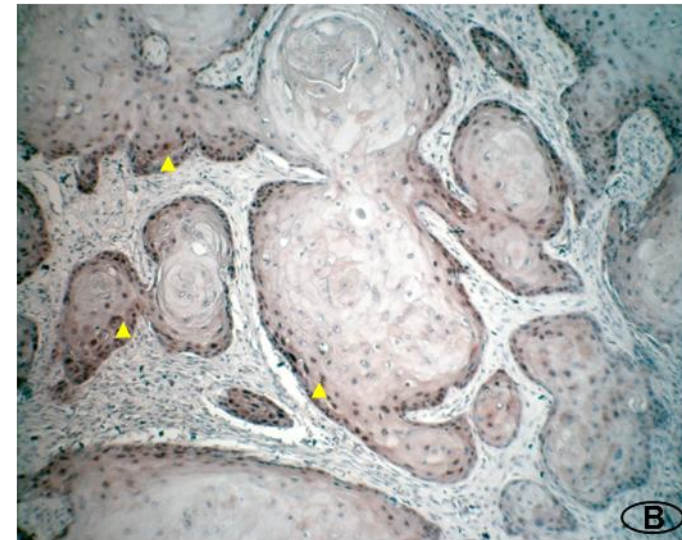
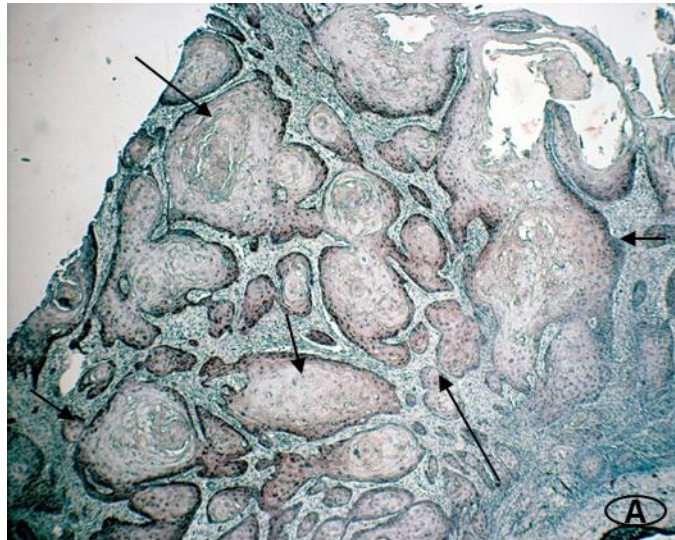


Figura 34.- Relación de la expresión de Bcl-2 y el estatus de los pacientes con CCECC.

La figura 34 muestra el estatus de los pacientes Bcl-2 positivos, como se puede notar, la mortalidad a causa de la enfermedad fue reportada en el 30% (8/27) de los casos inmunopositivos para dicho marcador, mientras que el 19% (5/27) permanecen vivos aún pero con la enfermedad. El 37% (10/27) corresponde a pacientes que aun siendo positivos para Bcl-2 están vivos libres de la enfermedad. Del 4% (1/27) de los pacientes no se obtuvo información ya que no se encontraba en la historia médica, ya sea porque no asistieron más a consulta o porque cambiaron de centro de tratamiento ($p=0,081$).

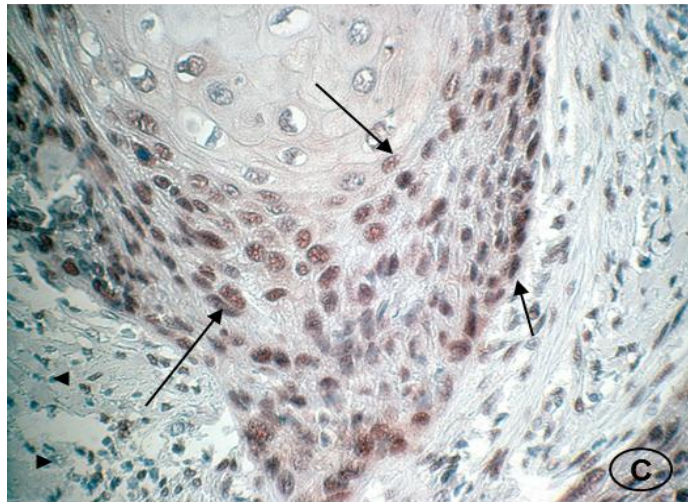
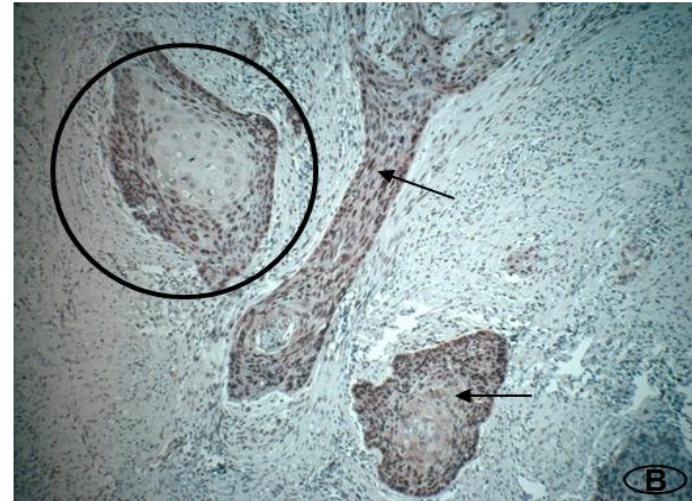
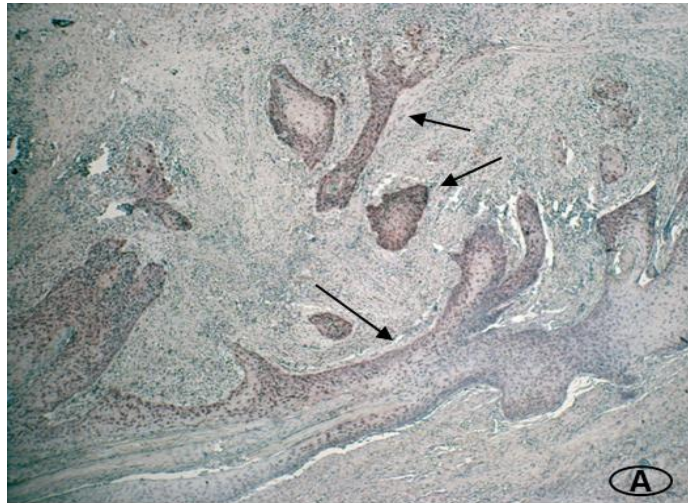
**Expresión de PCNA en tumores de pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

Figura 35.- Inmunomarcaje para PCNA en tumor de la cavidad oral



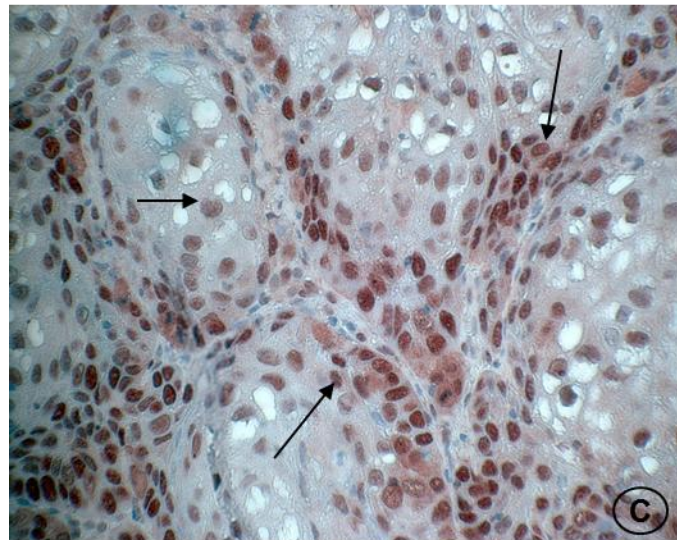
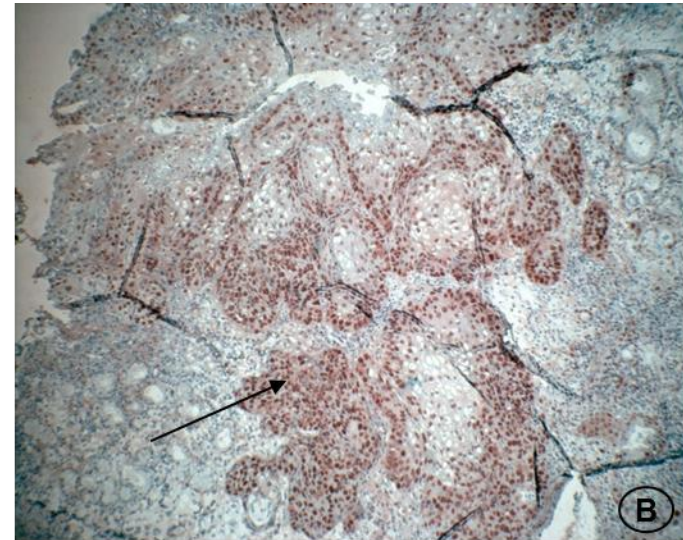
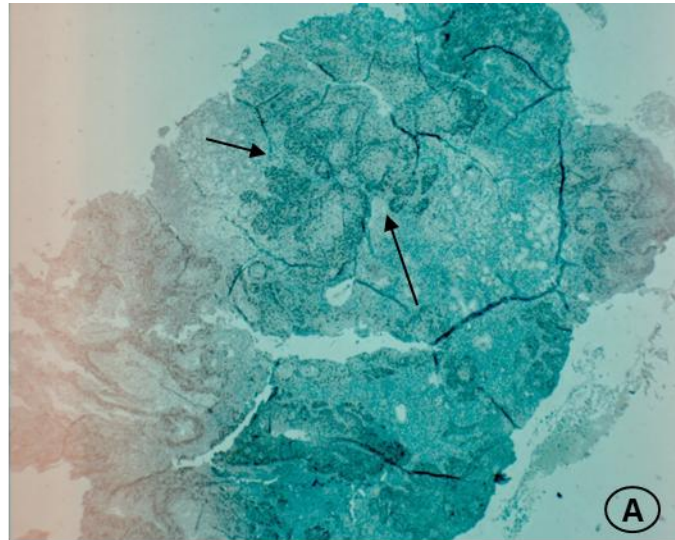
Estas figuras muestran micrografías que muestran tejidos correspondientes a tejidos de la cavidad oral al cual se le realizó inmunohistoquímica contra PCNA (antígeno de proliferación celular) , utilizando un anticuerpo primario monoclonal (1:100). En la Fig A, (4X) se pueden apreciar áreas con masas celulares que corresponden al tumor (flechas) y regiones de células sanas; en la fig. B, se puede notar el mismo tejido a un aumento de 10 X donde se señala con las cabezas de flechas en un área de tumor algunas células teñidas de color rojo. En la fig C, Se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala con flechas los núcleos coloreados en rojo que corresponden a células tumorales positivas para PCNA y algunos núcleos teñidos de color azul que son regiones sanas del tejido (hematoxilina) sin ningún marcaje.

Figura 36.- Inmunomarcaje para PCNA en tumor de la Laringe



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes a la laringe a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra PCNA (Antígeno de Proliferación Celular), utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. El tejido en sí corresponde a un carcinoma epidermoide algo diferenciado, queratinizado en algunas regiones del tumor, con infiltraciones del epitelio unidas al tumor. En la fig A. (4X) se pueden observar (Señalados por flechas) las “lengüetas” o las regiones infiltradas teñidas de color rojo, cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) en la fig B, donde se señala con flechas en una de las lengüetas algunas células teñidas de color rojo lo que indican positividad y encerrado en círculo se delimita la región ampliada en la Fig C. donde se observa (flechas) algunos núcleos de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-PCNA, y algunas células teñidas de color azul que corresponden a regiones sanas del tejido sin marcaje (cabeza de flechas)

Figura 37.- Inmunomarcaje para PCNA en tumor de la Orofaringe



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes a la orofaringe a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra PCNA (Antígeno de Proliferación Celular), utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. En la fig A. (4X) se pueden observar (Señalados por flechas) las áreas pertenecientes al tumor teñidas de color rojo, cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) en la Fig B. donde se señala con flechas las regiones de tumor que son apreciadas con mayor claridad y algunas células teñidas de color rojo lo que indican positividad, en la Fig C. donde se observa (flechas) algunos núcleos de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-PCNA.,.

**Expresión de PCNA en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
según la localización anatómica del tumor**

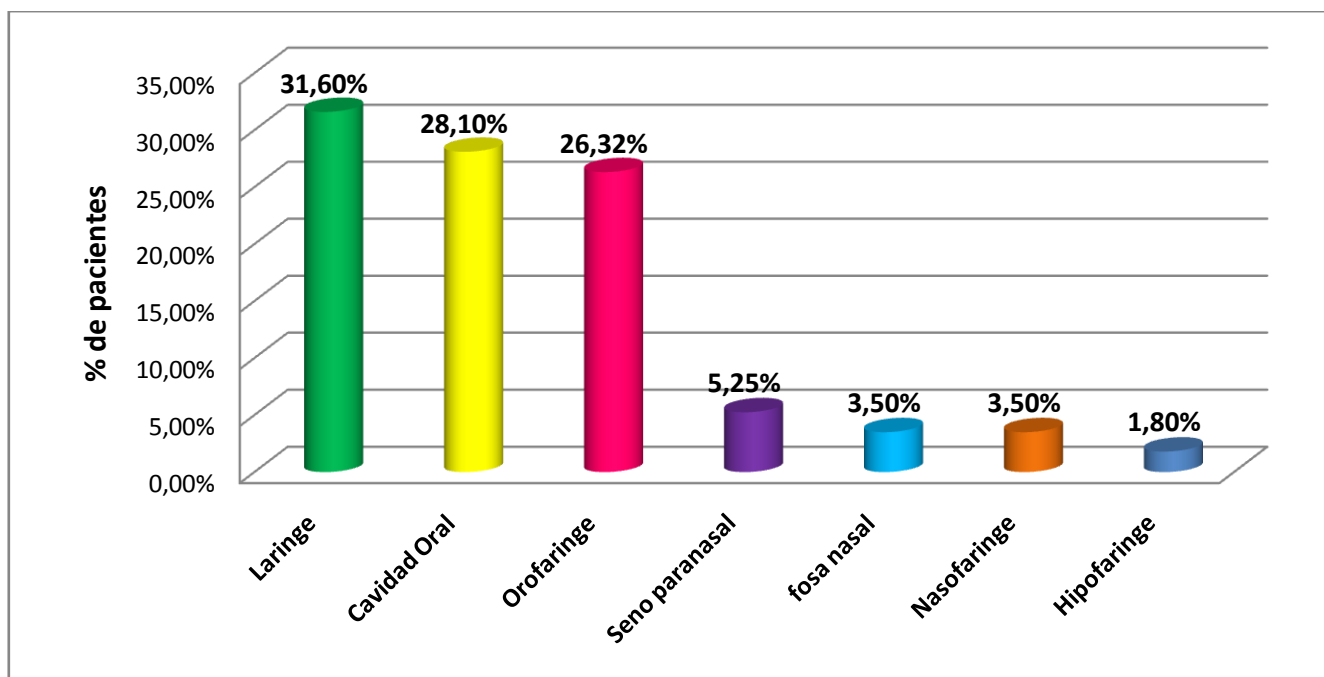


Figura 38.- Expresión de PCNA en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la localización anatómica del tumor

En la figura 32 se presentan los resultados de la inmunopositividad para PCNA según la localización anatómica del tumor primario. La localización con mayor frecuencia de positividad fue la laringe con 31,60% (18/57) de las muestras evaluadas, seguida de la cavidad oral con 28,1% (16/57) y la orofaringe con 26,32% (15/57). Igualmente se registró inmunomarcaje para dicho marcador en las otras localizaciones pero en menor proporción ($p=0,515$).

Extensión del marcaje para PCNA en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

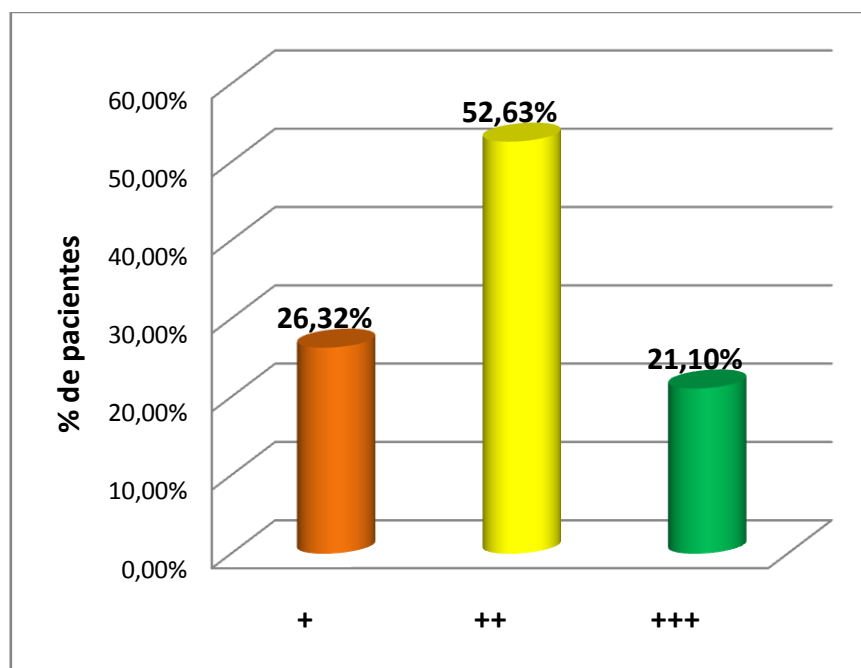


Figura 39.- Extensión del inmunomarcaje para PCNA en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

La figura 39 muestra los resultados de la intensidad del inmunomarcaje para PCNA en tumores de CCECC, como puede observarse la extensión de dos cruces (representa un 50% del tejido marcado) fue la observada con mayor frecuencia (52,63% (30/57)) seguido de muy poca extensión (26,32% (15/57)) o una amplia extensión del inmunomarcaje (21,10% (12/57)) cuyos valores son similares.

**Intensidad del marcaje para PCNA en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas
de Cabeza y Cuello**

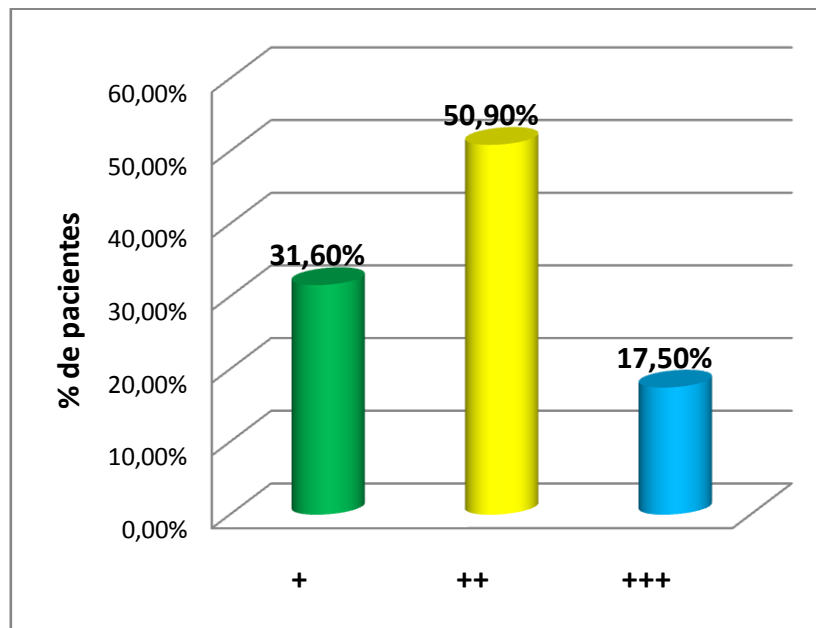


Figura 40.-Intensidad la inmunotinción para PCNA en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

En la figura 40 se muestran la intensidad de la inmunotinción para PCNA, en ella se puede notar que la intensidad moderada fue la que se observó con mayor frecuencia en las muestras evaluadas (50,90% (29/57)), seguida de una baja intensidad del marcaje (31% (18/57)), mientras que aquellos tejidos que presentaron una fuerte intensidad del marcaje solo correspondió al 17,5% (10/57) de los casos evaluados.

**Relación entre la expresión de PCNA y la persistencia de la enfermedad en pacientes con
Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

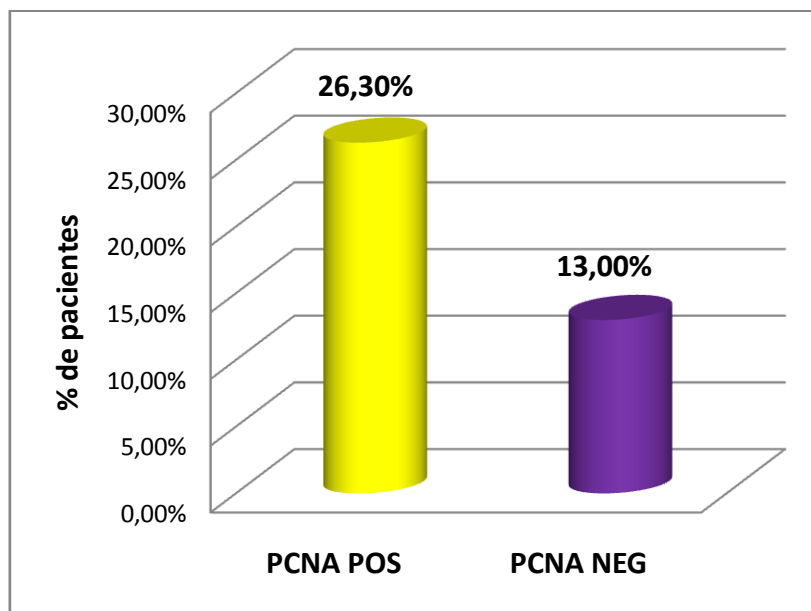


Figura 41.- Relación de la expresión para PCNA y la persistencia de la enfermedad

Como puede observarse en la figura 41 aquellos pacientes que presentaban tumores PCNA positivos poseían una mayor tasa de persistencia de la enfermedad (26,3% (15/57)) mientras que al ser PCNA negativos la persistencia solo se observó en el 13% (3/23) de los pacientes estudiados ($p=0,270$).

**Relación entre la expresión de PCNA con el estatus actual de los pacientes con
Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

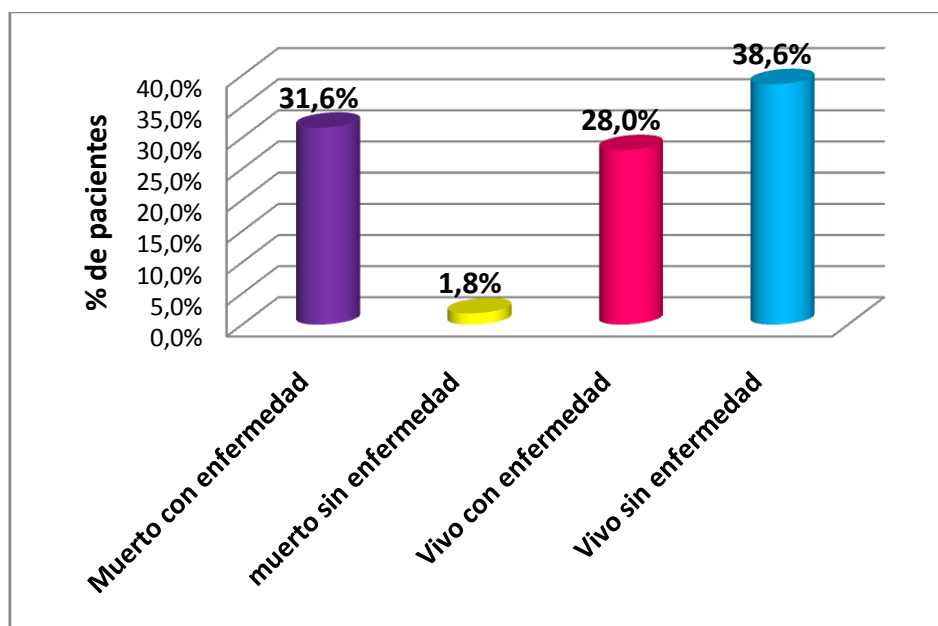
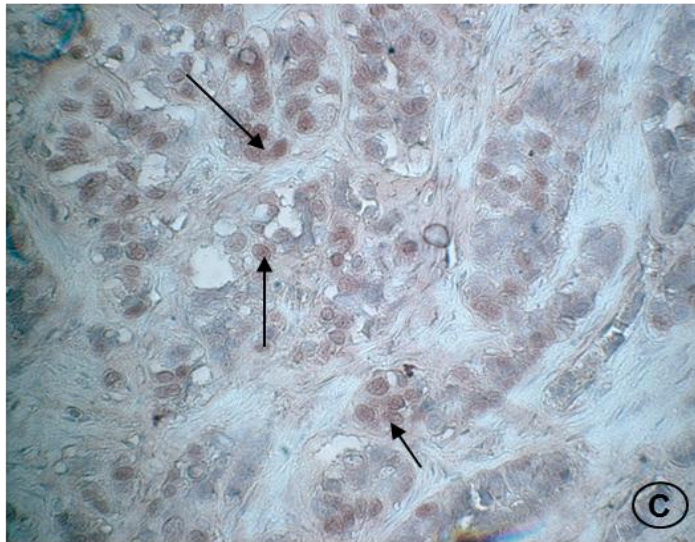
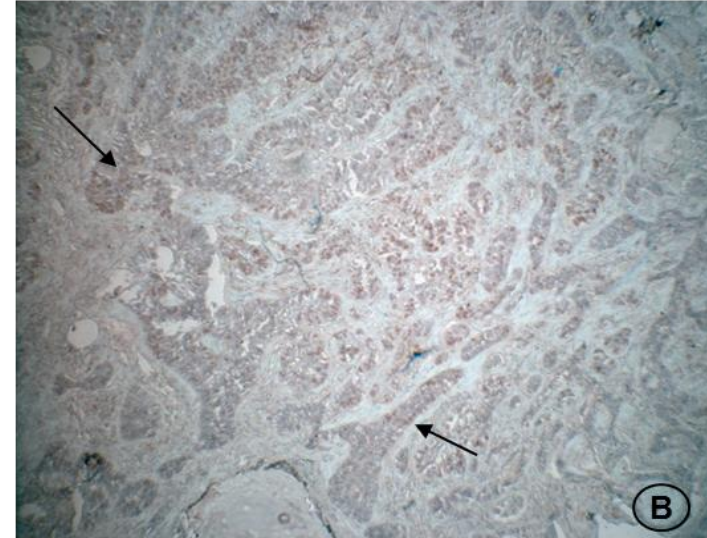
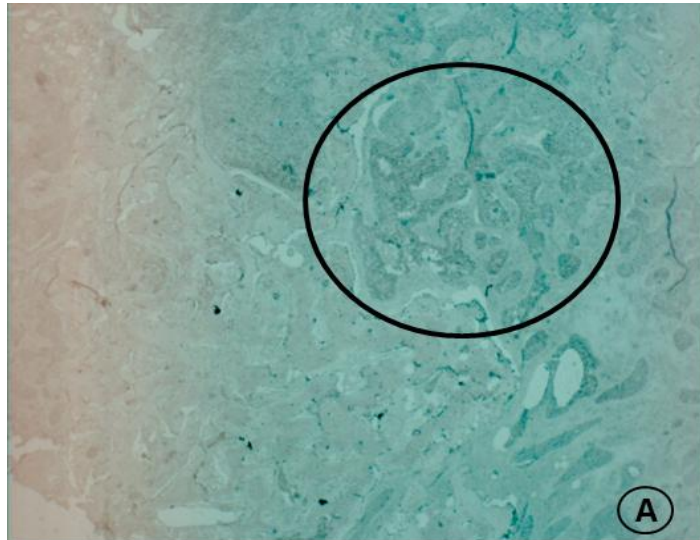


Figura 42.- Relación entre la inmunopositividad para PCNA y el estatus actual del paciente

La figura 42 muestra la relación entre la positividad para PCNA y el estatus de los pacientes, como puede notarse la tasa de mortalidad en pacientes PCNA positivos es de 34,6% (18/57) sin embargo la tasa de supervivencia libre de enfermedad presenta un valor similar (38,6% (22/57)), mientras que la tasa de supervivencia con de enfermedad es de 28% (16/57). La muerte sin enfermedad es casi despreciable con un valor de 1,8% (1/57) ($p=0,361$).

**Expresión de Ki-67 en tumores de pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

Figura 43.- Inmunomarcaje para Ki-67 en tumor de Senos Paranasales



En estas imágenes, se pueden observar tres micrografías que corresponden a tejidos pertenecientes al seno paranasal a los cuales se les realizó inmunohistoquímica contra Ki-67 (proteína de proliferación celular), utilizando para ello un anticuerpo monoclonal con dilución 1:100. El tejido en sí corresponde a un carcinoma epidermoide algo colagenizado, con infiltraciones. En la fig A. (4X) se pueden observar (delimitado por una circunferencia) una región de color rojo que son áreas pertenecientes al tumor, cuando se realiza la observación a un mayor aumento (10X) fig B, se puede observar señalado con flechas algunas células teñidas de color rojo lo que indican positividad y un mayor detalle del área del tumor, en la Fig C. se observan (flechas) algunos núcleos de células coloreados de rojo indicando su positividad para el anticuerpo utilizado en este caso que es Anti-Ki-67.

Expresión de Ki-67 en Pacientes con Carcinoma de Células Escamosas según la localización anatómica del tumor

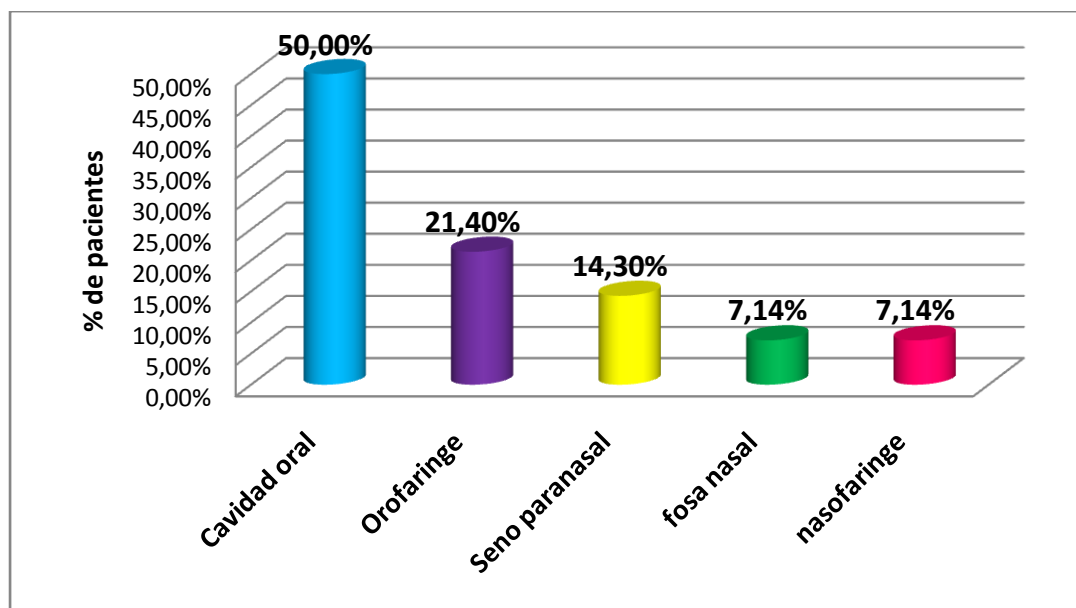


Figura 44.- Expresión de Ki-67 según la localización anatómica del tumor primario

Como puede observarse en la figura 44, la localización anatómica del tumor con mayor inmunopositividad para Ki-67 fue la cavidad oral con un 50% de muestras positivas (7/14), seguido por la orofaringe con un 21,4% (3/14) y los senos paranasales con 14,3% (2/14). Los tumores de las fosas nasales así como los de nasofaringe fueron los que presentaron la menor positividad para el marcados con 7,14% cada una de ellas (1/14) ($p=0,049$).

**Intensidad del marcaje para Ki-67 en pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

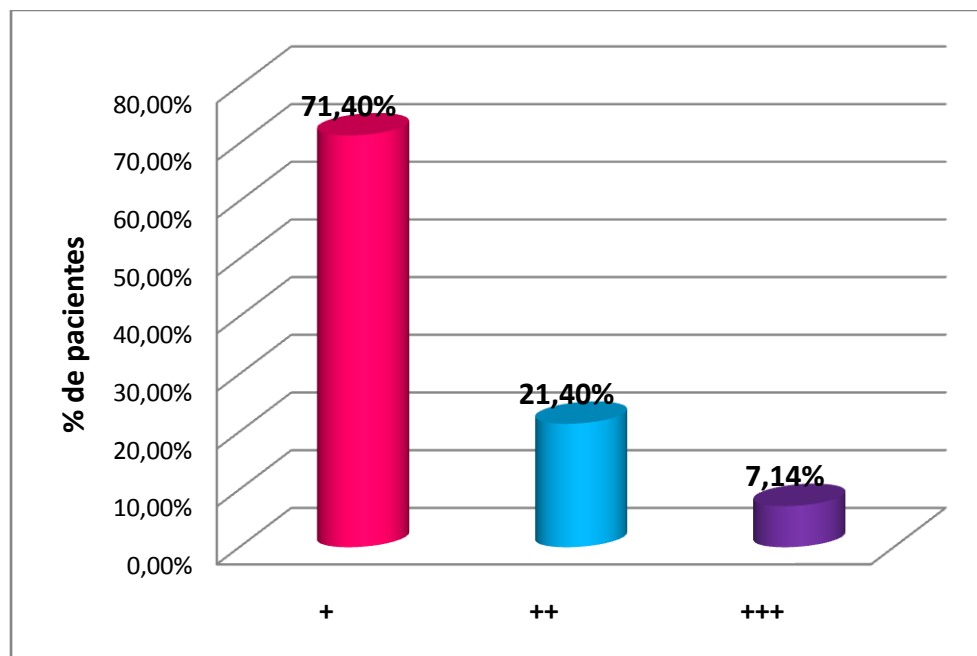


Figura 45.- Intensidad del inmunomarcaje para Ki-67 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

En la figura 45 se puede observar que el 71,4% (10/14) presentaron una baja intensidad del marcaje para el marcador tumoral evaluado, 21,4% (3/14) presentaron una intensidad moderada mientras que sólo un 7,14% (1/14) presentaron una fuerte intensidad del marcaje.

**Extensión del marcaje para Ki-67 en pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

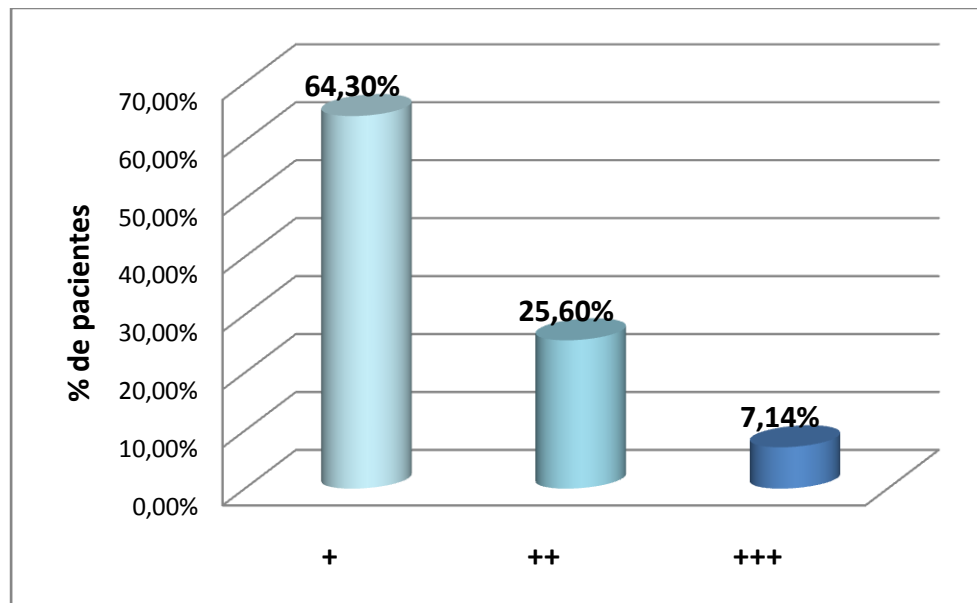


Figura 46.- Extensión del marcaje para Ki-67 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

Como muestra la figura 46, un marcaje en más del 50% del tejido tumoral evaluado solo se pudo observar en el 7,14% de los pacientes (1/14), por el contrario aquellos tumores que presentaba una inmunopositividad en al menos la mitad de las células que lo conformaban representan el 25,5% (4/14), el 64,3% (9/14) presentó inmunomarcaje en menos del 25% de las células que conformaban el tejido analizado.

**Relación entre la inmunopositividad para Ki-67 y la persistencia de la enfermedad
en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

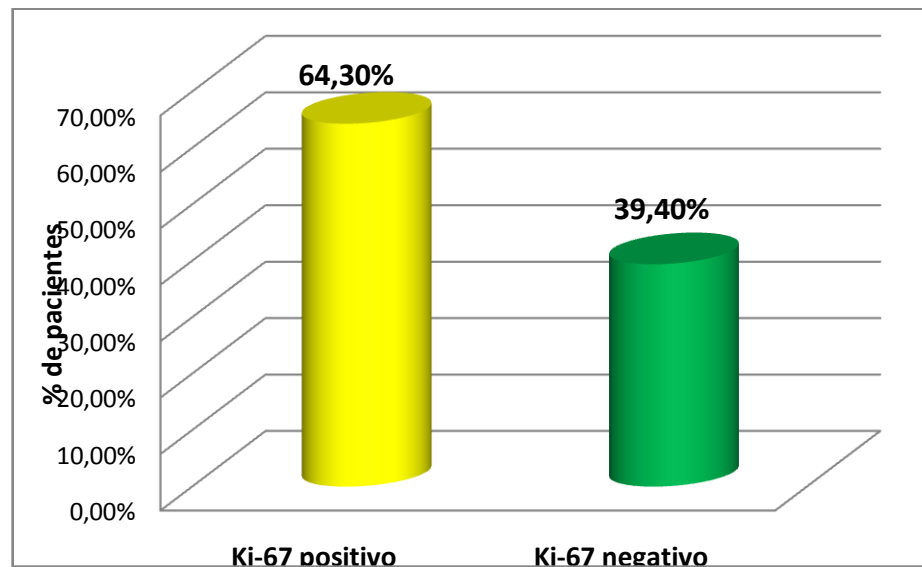


Figura 47.- Relación entre la inmunopositividad para Ki-67 y la persistencia de la enfermedad

La figura 47, muestra los resultados de la relación existente entre la inmunopositividad para Ki-67 con la persistencia de la enfermedad en los pacientes evaluados. El 64,3% (9/14) de los pacientes positivos para el marcador tumoral presentan una enfermedad persistente mientras que en los pacientes Ki-67 negativos la persistencia se observó 39,4% (23/66) de los pacientes analizados ($p=0,295$).

Relación entre la expresión de Ki-67 y el estatus actual de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

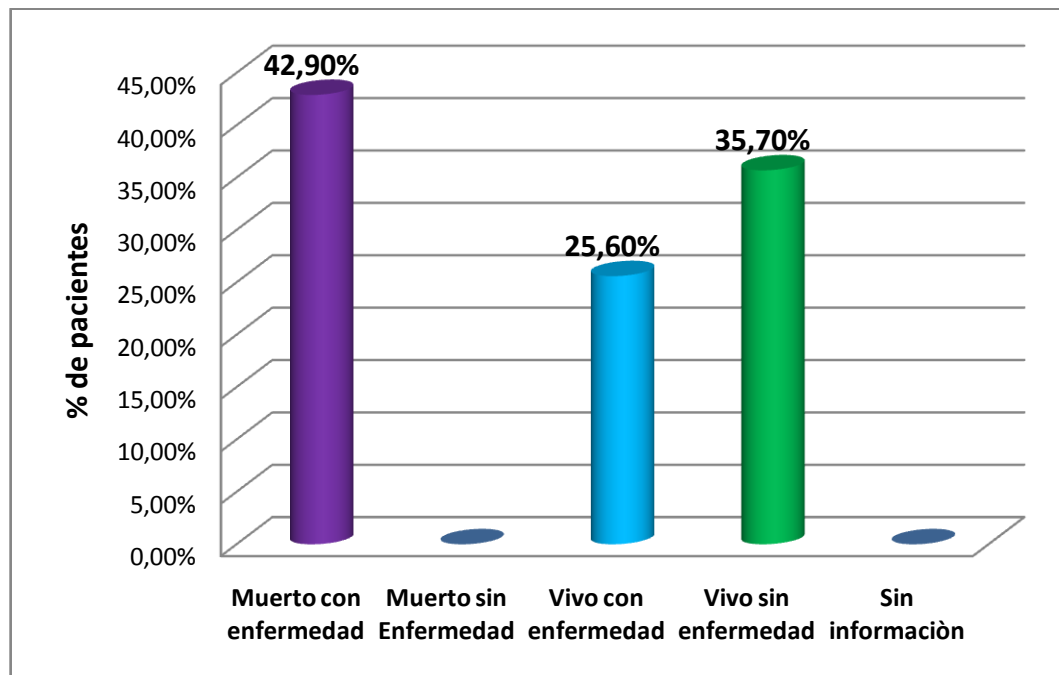
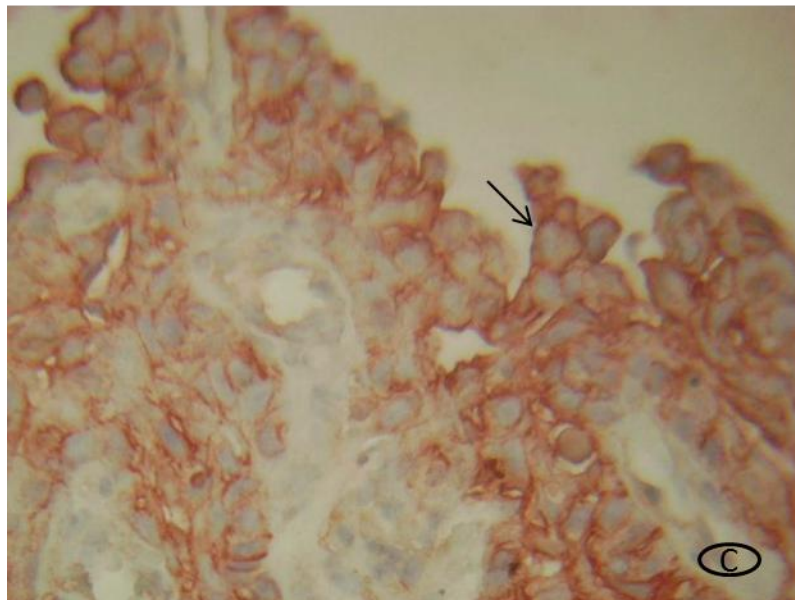
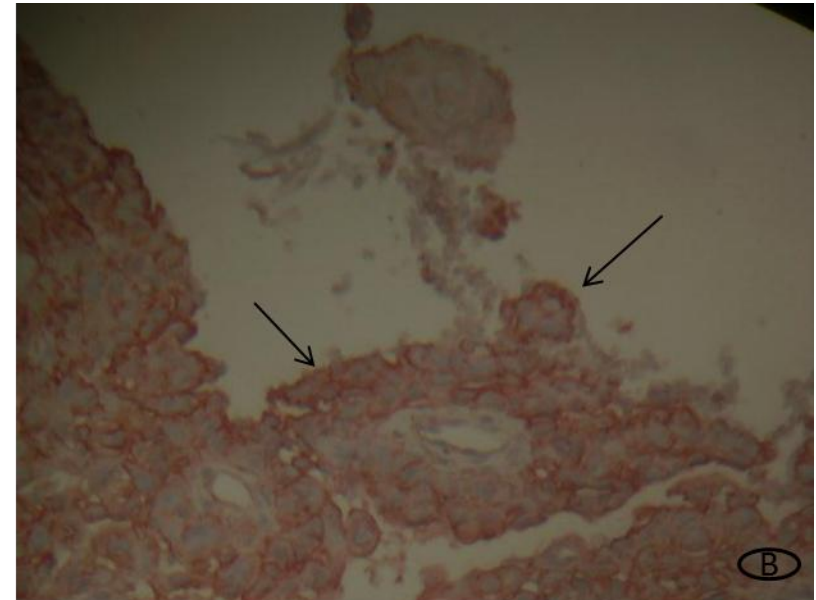
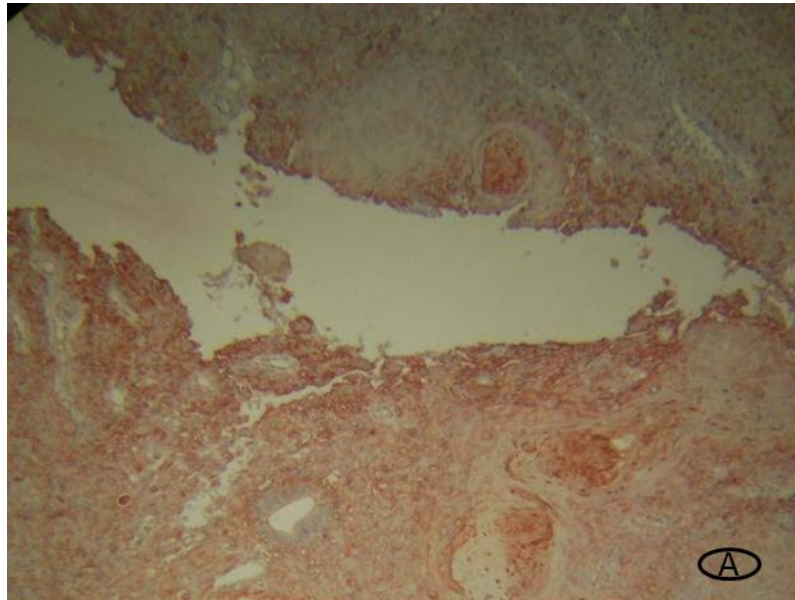


Figura 48.- Relación entre la positividad para Ki-67 y el estatus de los pacientes

La mortalidad asociada a la positividad para Ki-67 se muestra en la figura 48, como puede verse el 42,9% de los pacientes Ki-67 positivos fallecieron a causa de la patología. Por otro lado se puede observar también que el 25,6% de estos pacientes positivos para el marcador tumoral permanecen vivos aun con la enfermedad mientras que el 35,7% son pacientes que lograron curarse y actualmente viven libre de la enfermedad ($p= 0,678$).

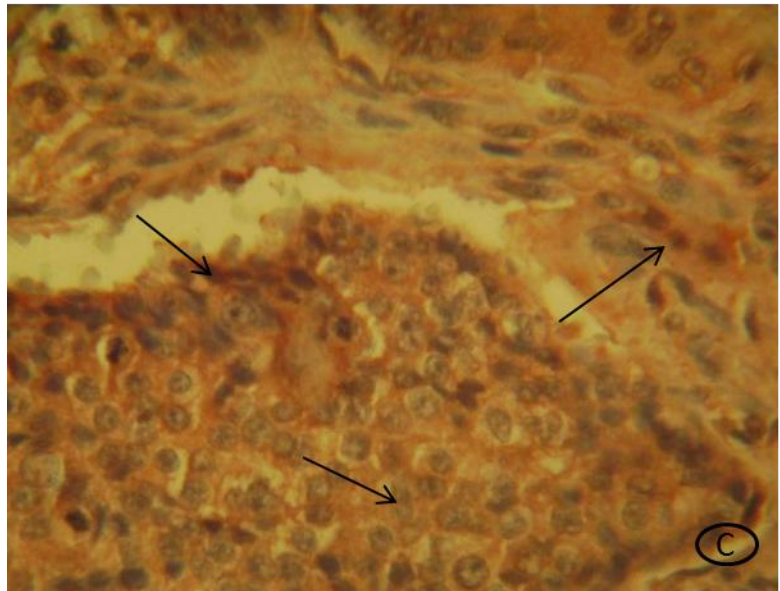
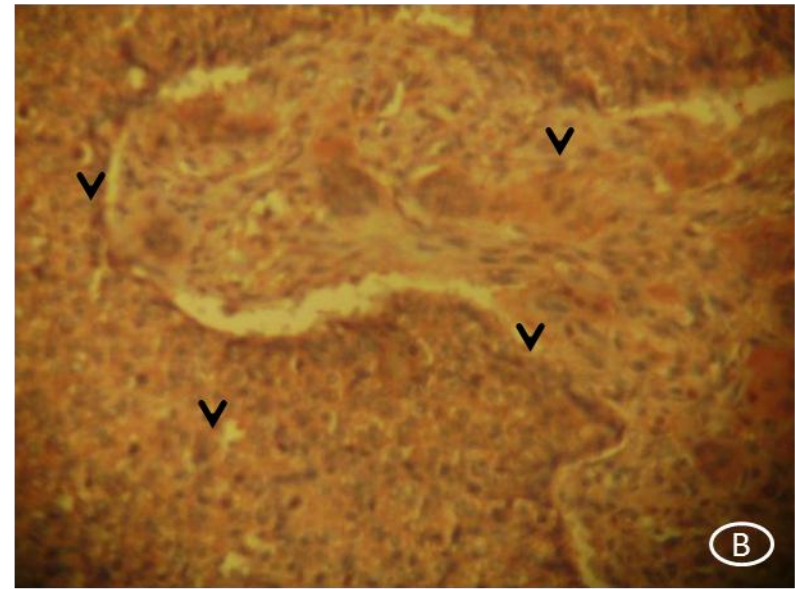
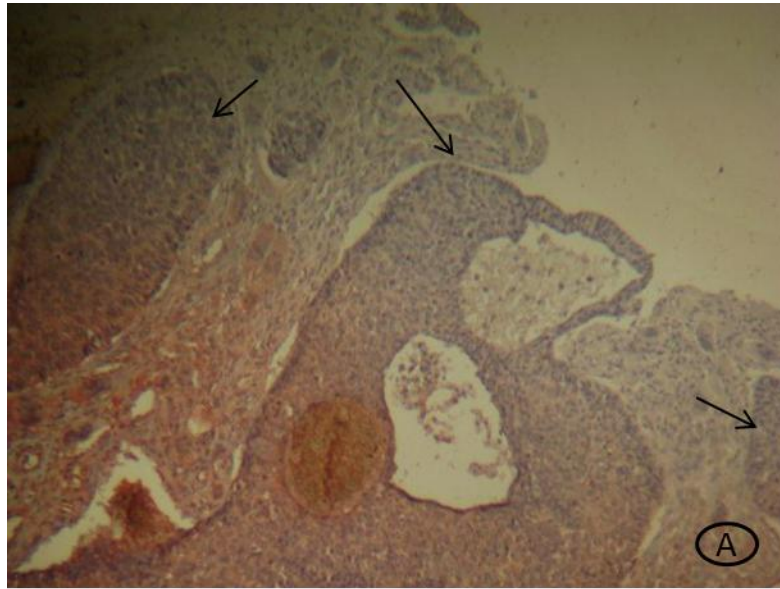
**Expresión de EGFR en tumores de pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

Figura 49- Inmunomarcaje para EGFR en tumor de Orofaringe



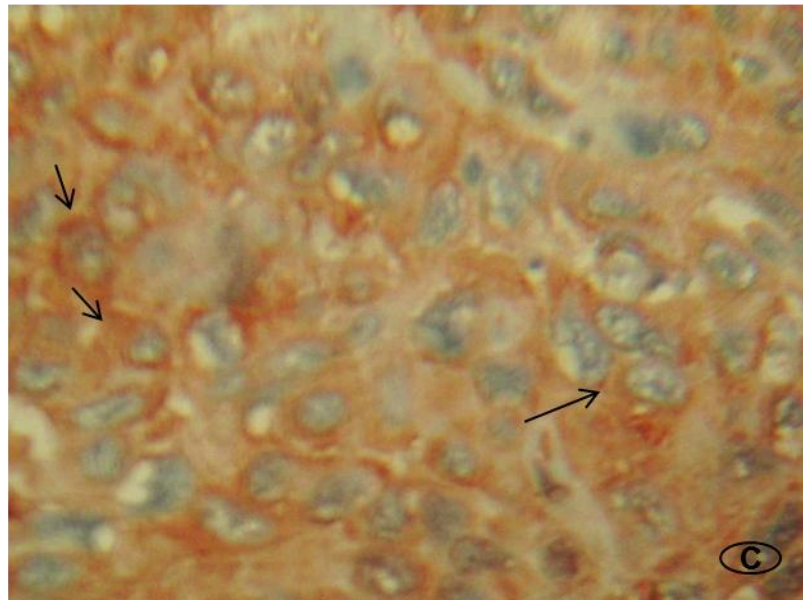
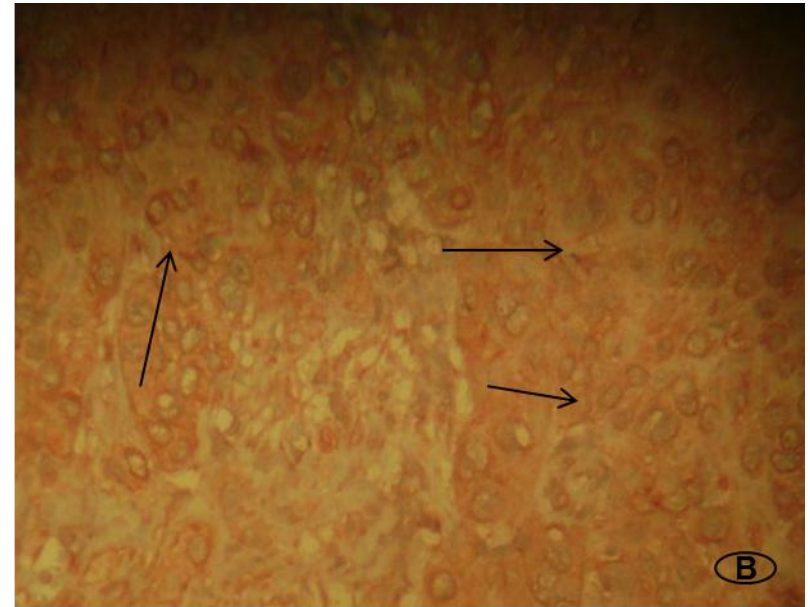
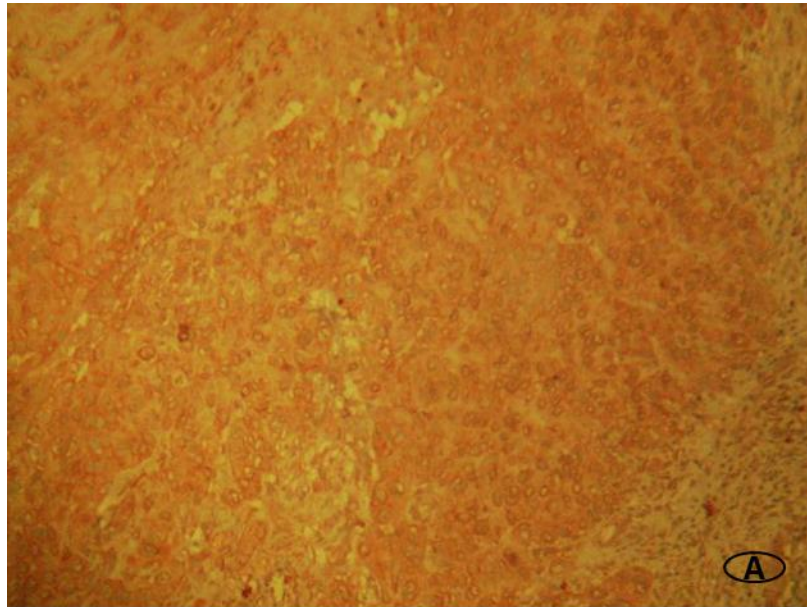
En estas imágenes se pueden observar unas micrografías que corresponden a un tejido de la Orofaringe, al cual se le realizó inmunohistoquímica contra EGFR, utilizando un anticuerpo primario monoclonal en una dilución 1:100. En la Fig A, (aumento 4X) Un marcaje intenso y en la mayoría del tejido así como regiones de células sanas, en la fig. B, se pueden notar el mismo tejido a un aumento de 10X donde se señalan (flechas) en un área de tumor células con membranas teñidas de color rojo, lo que indica su positividad para EGFR. En la Fig. C, se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala con flechas algunas células de color rojo que muestran positividad para EGFR y algunos sin tinción que corresponden a regiones sanas del tejido sin ningún marcaje. Se observan igualmente los núcleos teñidos de azul

Figura 50.- Inmunomarcaje para EGFR en tumor de Laringe



En estas imágenes se pueden observar unas micrografías que corresponden a un tejido de la laringe, en el que se realizó inmunohistoquímica contra EGFR, utilizando un anticuerpo primario monoclonal en una dilución 1:100. En la Fig A, (aumento 4X) se pueden apreciar áreas con una organización que asemejan una masa celular que corresponden al tumor (flechas) y regiones de células sanas. En la fig. B, se pueden notar el mismo tejido a un aumento de 10X donde se señalan (cabeza de flechas) en un área de tumor algunas células teñidas de color rojo, lo que indica su positividad para EGFR. En la Fig. C, se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala con flechas algunas células con membranas y citoplasmas teñidos de color rojo que muestran positividad para EGFR,

Figura 51.- Inmunomarcaje para EGFR en tumor de Cavidad Oral



En estas imágenes se pueden observar unas micrografías que corresponden a un tejido de la Cavidad oral (lengua) , en el que se realizó inmunohistoquímica contra EGFR, utilizando un anticuerpo primario monoclonal en una dilución 1:100. En la Fig A, (aumento 4X) se pueden apreciar un marcaje bastante extenso. En la fig. B, se pueden notar el mismo tejido a un aumento de 10X donde se señalan (flechas) en un área de tumor algunas células teñidas de color rojo, lo que indica su positividad para EGFR. En la Fig. C, se observa un mayor aumento del mismo tejido (40X) donde se señala con flechas algunas células con membranas y citoplasmas teñidos de color rojo que muestran positividad para EGFR,

Expresión de EGFR en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del tumor

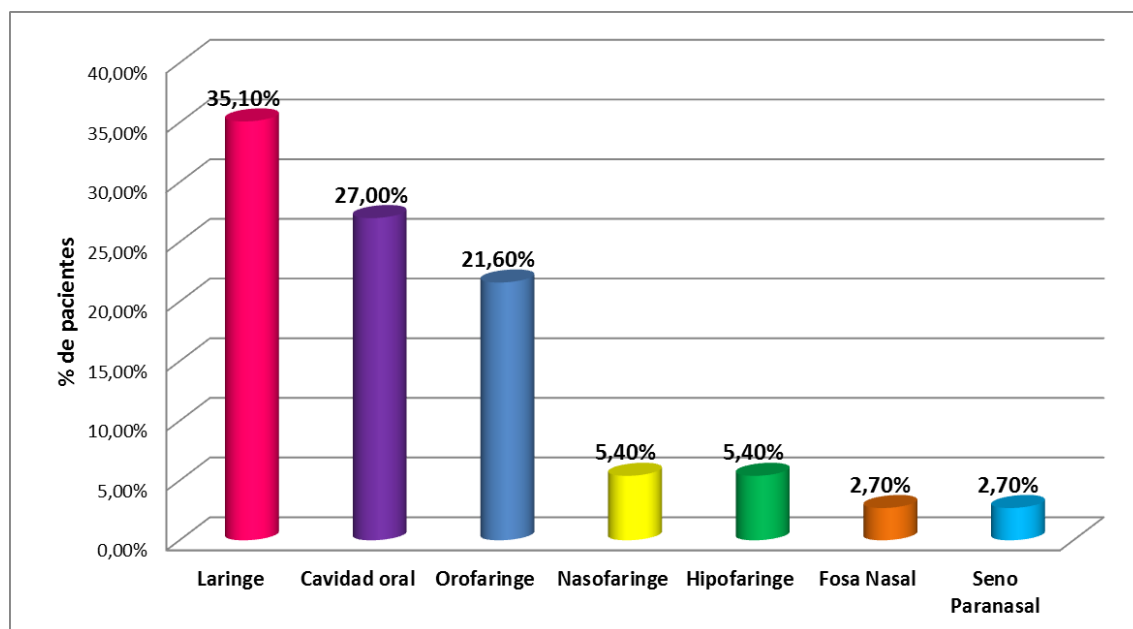


Figura 52.-Expresión de EGFR según la localización anatómica del tumor primario.

Como puede observarse en la figura 52, la localización anatómica del tumor con mayor inmunopositividad para EGFR fue la laringe con un 35,1% de muestras positivas (13/37), seguido por la cavidad oral con un 27% (10/37) y la orofaringe con 21,6% (8/37). Los tumores de las fosas nasales así como los de senos paranasales fueron los que presentaron la menor positividad para el marcador con 2,7% cada una de ellas (1/37). Por otro lado también se observó inmunopositividad para EGFR en los tumores de nasofaringe e hipofaringe con una frecuencia de 5,4% (2/37) de los tumores evaluados ($p=0,739$).

**Intensidad del marcaje para EGFR en pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

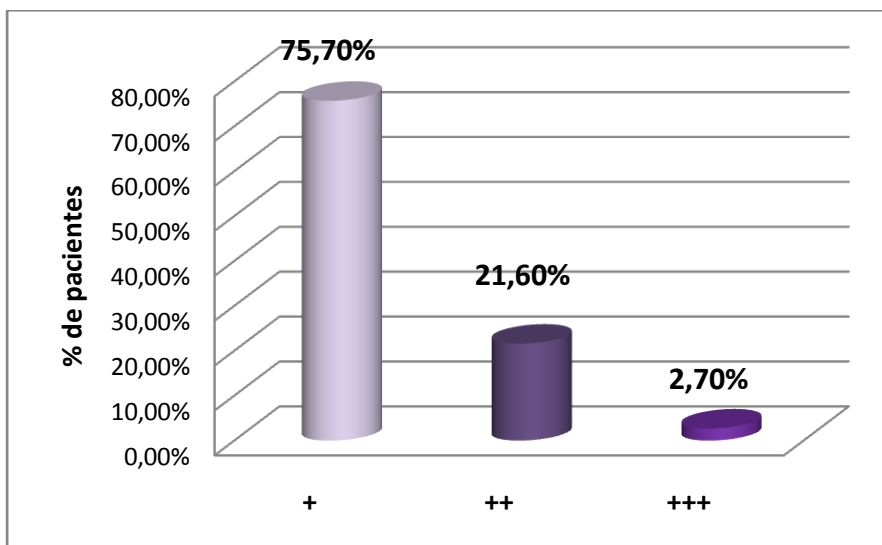


Figura 53.- Intensidad del marcaje para EGFR en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

En la figura 53 se puede observar que el 75,7% (28/37) presentaron una baja intensidad del marcaje para EGFR, 21,6% (8/37) presentaron una intensidad moderada mientras que sólo un 2,7% (1/37) presentaron una fuerte intensidad del marcaje.

**Extensión del marcaje para de EGFR en pacientes con Carcinoma de Células
Escamosas de Cabeza y Cuello**

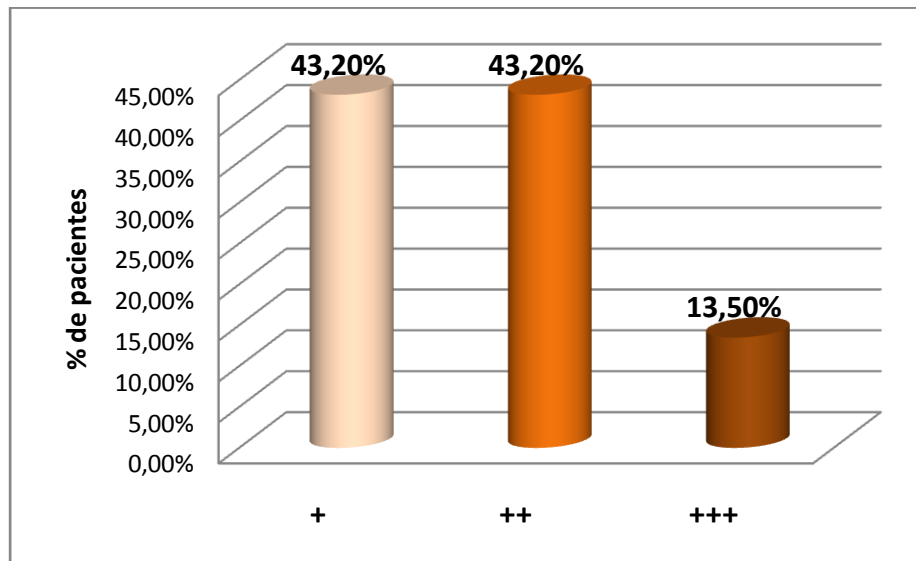


Figura 54.- Extensión del marcaje para EGFR en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

Como muestra la figura 54, un marcaje en más del 50% del tejido tumoral evaluado solo se pudo observar en el 13,50% de los pacientes (5/37), por el contrario aquellos tumores que presentaba una inmunopositividad en al menos la mitad de las células que lo conformaban o menos representan el 43,2% (16/37) cada uno.

**Relación entre la expresión de EGFR y la persistencia de la enfermedad en
pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

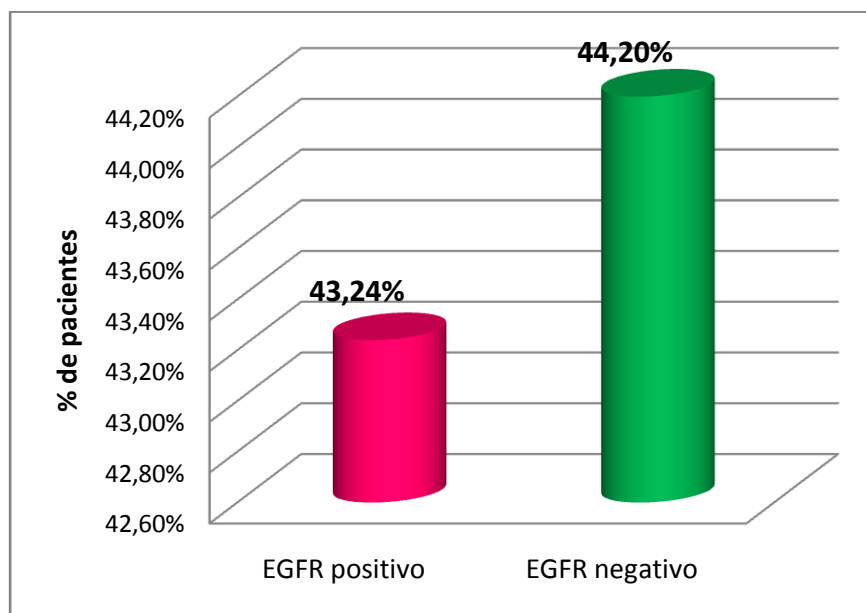


Figura 55.- Relación entre la expresión de EGFR y la persistencia de la enfermedad

La figura 56 muestra los resultados de la relación existente entre la inmunopositividad para EGFR con la persistencia de la enfermedad en los pacientes evaluados. El 43,24% (16/37) de los pacientes positivos para el marcador tumoral presentan una enfermedad persistente mientras que en los pacientes EGFR negativos la persistencia fue similar con 44,2% (19/43) de los pacientes analizados ($p=0,484$).

Relación entre la expresión de EGFR y el estatus actual de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

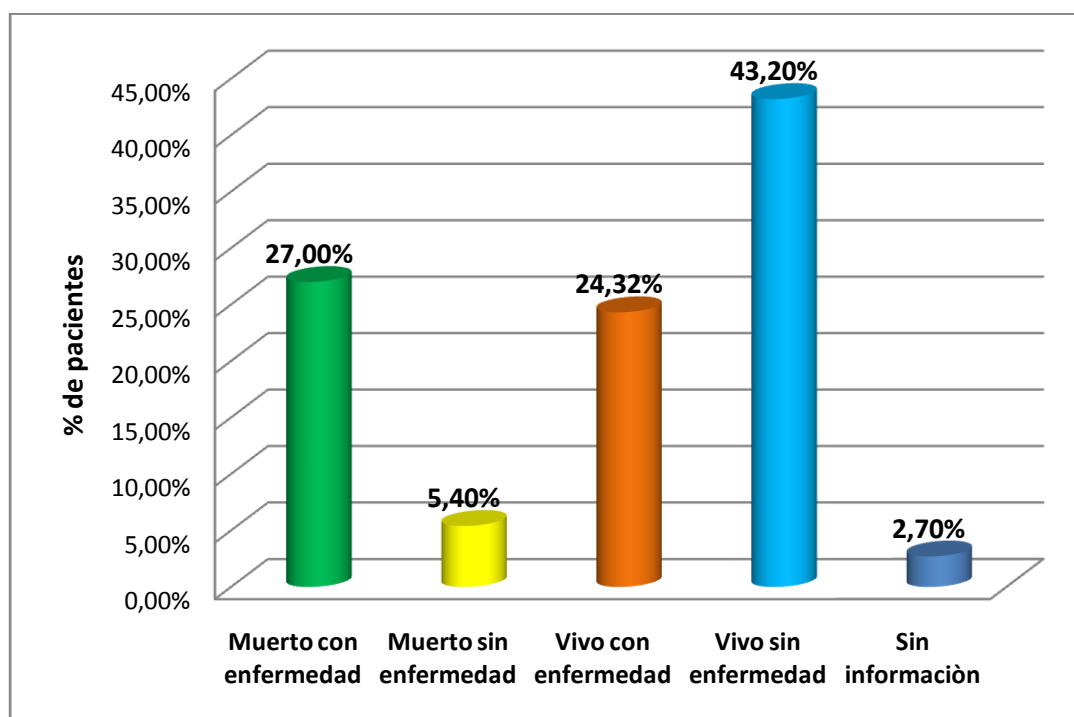


Figura 56.- Relación entre la Expresión para EGFR y el estatus de los pacientes

La mortalidad asociada a la positividad para EGFR se muestra en la figura 56, como puede verse el 43% de los pacientes EGFR positivos sobreviven a la enfermedad y hasta la fecha registrada en las historias clínica permanecían libres de la misma, por otro lado el 24,3% permanecen vivos pero con una enfermedad persistente. El 27% de los pacientes EGFR positivos fallecieron a causa de la patología mientras que el 5,4% de estos pacientes fallecieron por otras causas ajenas a la enfermedad ($p=0,682$).

Tabla 14.- Relación entre la expresión de los marcadores moleculares con la persistencia de la enfermedad y con el estatus actual de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

Marcador	Persistencia	Estatus actual del paciente					p- valor
		Muerto con enfermedad	Muerto sin enfermedad	Vivo con Enfermedad	Vivo sin enfermedad	Sin Información	
P53 n=33	30%	30%	-	33%	33%	3%	p>0,05
Bcl-2 n=27	42%	30%	11%	19%	37%	4%	p>0,05
PCNA n=57	26%	31%	1,8%	28%	38,6%	-	p>0,05
Ki-67 n=14	60%	43%	-	26%	36%	-	p>0,05
EGFR n=37	43%	27%	5%	24%	43%	3%	p>0,05

En la tabla 14 se muestra un resumen de la relación existente entre la expresión de los marcadores moleculares evaluados en pacientes con CCC con la persistencia de la enfermedad así como con el estatus actual de los mismos. En ella se puede notar que aquellos pacientes positivos para el marcador de proliferación Ki-67 fueron los que presentaron mayor persistencia de la enfermedad (60%), así como una mayor mortalidad asociada (43%). EGFR por su parte presenta la menor tasa de persistencia con 27%, mientras que las probabilidades de mantener una vida libre de enfermedad es la más elevada (43%), sin embargo es importante resaltar que vivir con la enfermedad

o morir a causa de ella ocupa valores considerables, que pueden observarse en 24% y 27% respectivamente. Para el caso de las oncoproteínas P53 y Bcl-2 los resultados son similares, un 30% y 42% de los pacientes presentó enfermedad persistente respectivamente, para ambos marcadores el 30% murió como consecuencia de la malignidad, mientras que cerca del 35% puede curarse.

Si bien PCNA fue el marcador molecular con mayor número de casos positivos cabe destacar que la persistencia relacionada con él es bastante baja (26%), con un elevado número de pacientes que pueden curarse y mantener una vida libre de enfermedad (38,6%).

Evaluación de molecular del gen E6 de VPH-16 en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

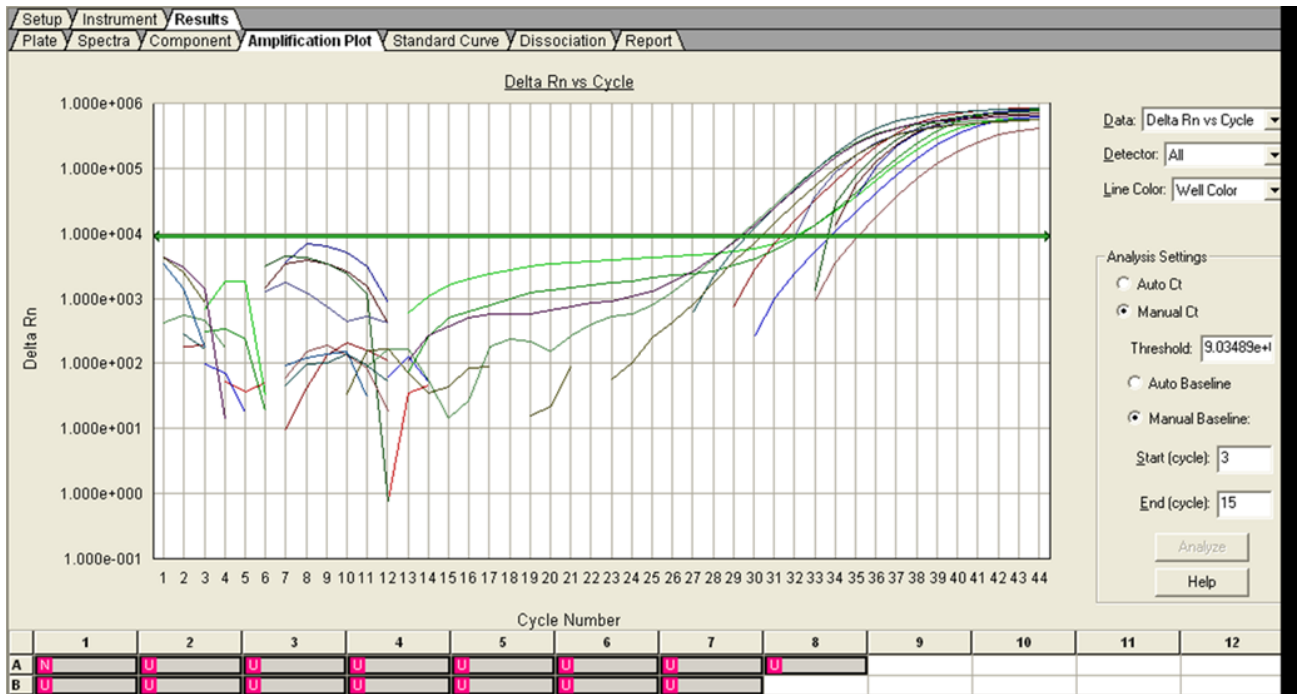


Figura 57.- Curva de amplificación para E6 de VPH-16 en muestras de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

En la figura 57, se muestran los resultados de amplificación arrojados por el software para E6 de VPH-16 en muestras de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en la que se puede apreciar diferencias con respecto a los ciclos en los que se detectan los amplicones. Aquellas muestras que presentan mayor cantidad de ADN son detectadas en los primeros ciclos de amplificación mientras que aquellas que tienen menor cantidad de ADN amplifican alrededor del ciclo 30.

Curva de disociación para el gen E6 de VPH-16 en muestras de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

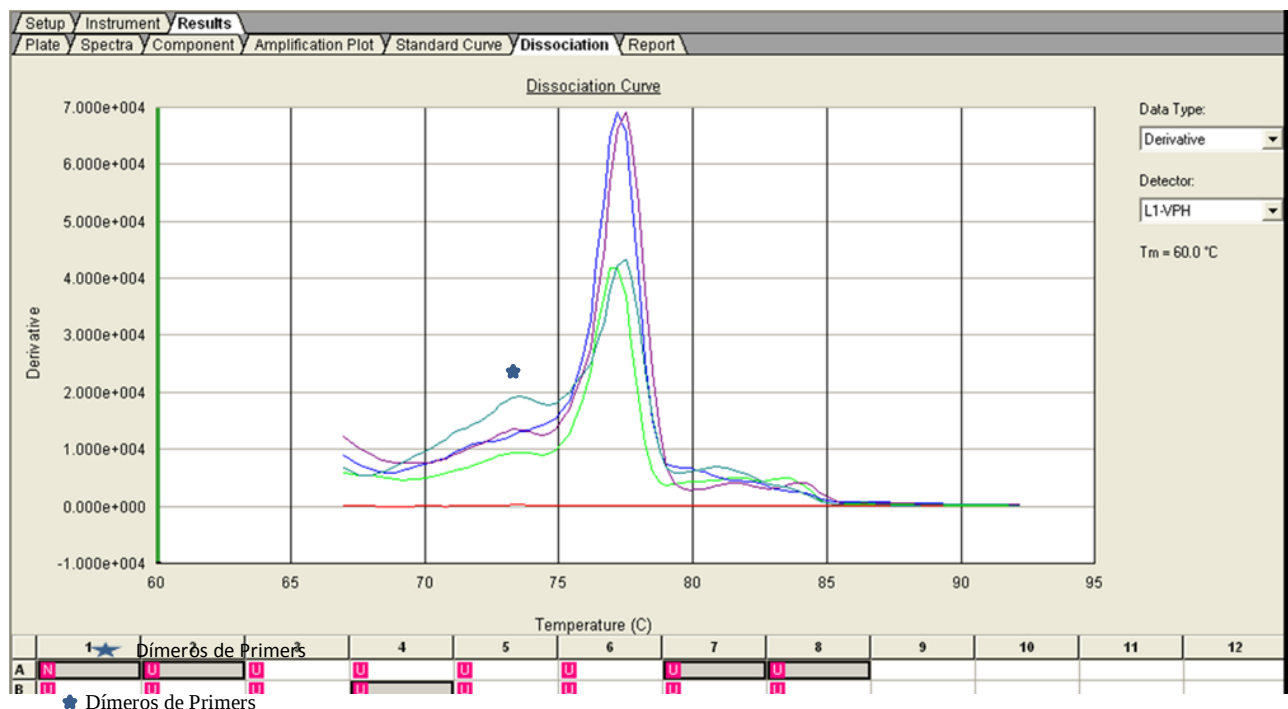


Figura 58.- Curva de disociación para E6 de VPH-16 en muestras de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

En la figura 58 se observa una curva de amplificación de algunas de las muestras evaluadas en donde se puede notar la amplificación del fragmento esperado, en todas ellas. Igualmente se puede notar la ausencia de amplificación en el control negativo (NTC) indicando ausencia de contaminantes e inespecificidades en el proceso de amplificación (línea de color rojo). Por otro lado se puede notar que se obtuvo otro pico de amplificación que al realizar la electroforesis en gel de agarosa correspondía a dímeros de primer (señalados con una estrella).

**Electroforesis en gel de agarosa para el gen E6 de VPH-16 en muestras de pacientes con
Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello**

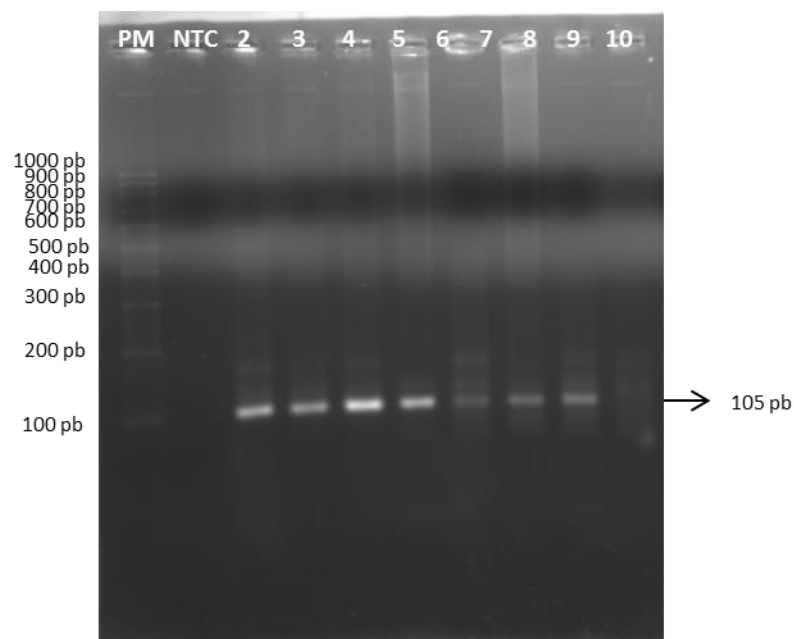


Figura 59.- Visualización de Análisis de Carga para el gen E6 de VPH-16 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; **PM**: Marcador de peso molecular (100 pb Invitrogen); **NTC**: Control negativo (mezcla de PCR+ primers y agua desionizada); **1-9**: Muestras de pacientes positivas para la detección del gen E6 de VPH-16. **10**: Muestra en la que no pudo cuantificarse el gen E6 de VPH-16 mediante qRT-PCR.

Curvas de disociación para E2 de VPH-16 en muestras de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

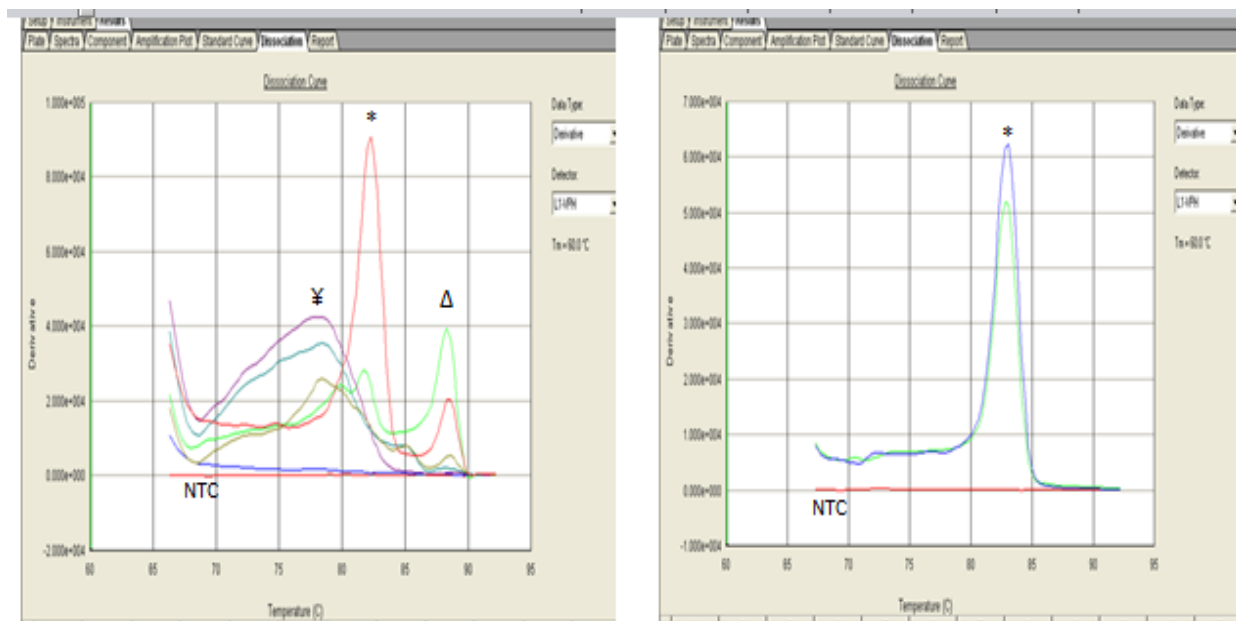


Figura 60.- Curvas de disociación para E2 de VPH-16 en muestras de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello. (A) una muestra positiva y muestras negativas para E2. (B) Muestras positivas para E2. ¥ Dímeros de Primers; Δ Inespecificidades; * Amplificado esperado de E2.

En la figura 60 se observan las curvas de disociación de algunas de las muestras evaluadas en donde se puede notar la amplificación del fragmento esperado para el gen E2 de VPH (B). Igualmente se puede notar la ausencia de amplificación en el control negativo (NTC) indicando ausencia de contaminantes e inespecificidades en el proceso de amplificación. En la figura (A), se observa que en una de las muestras evaluadas se obtuvo el amplificado correspondiente a E2, igualmente en la misma figura se puede notar que hay curvas en las que solo se obtuvieron dímeros de primers así como bandas inespecíficas más no el fragmento de E2, lo cual fue corroborado mediante electroforesis en geles de agarosa, por lo que fueron consideradas negativas.

Tabla 15.- Carga Viral y Estatus físico del ADN de VPH16 contenidos en CCECC en relación a los parámetros pacientes con Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (*ND: No Determinado. **NA:No Aplica)

Sitio del tumor	Datos clínicos		VPH	Carga viral y estatus físico de VPH 16			
	T	N		Copias de E6/ β -globina	Copias de E2/ β -globina	Radio E2/E6	Estatus físico del virus
Orofaringe	4	2b	16 y 18	ND*	0	No E2	Integrado
Laringe	3	0	16	4	0	No E2	Integrado
Laringe	4	3	16	4	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	4	0	16	4	0	No E2	Integrado
Orofaringe	2	0	16	16	5	0,8	Mixto
Cavidad Oral	3	0	16	9	0	No E2	Integrado
Orofaringe	4	3	16	20	4	1,75	Episomal
Cavidad Oral	2	0	16,18 y 31	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	4	2b	16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6 y 16	5	0	No E2	Integrado
Orofaringe	3	0	16	2	0	No E2	Integrado
Laringe	4	0	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,11 y 16	8	0	No E2	Integrado
Orofaringe	4	0	161	10	7	0,5	Mixto
Cavidad Oral	2	3	6,11 y 16	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	4	2b	11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	1	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Hipofaringe	4	2c	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	3	3	6,11 y 16	4	0	No E2	Integrado
Laringe	3	0	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	0	6,11,16,18	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	3	0	6,11 y 16	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Nasofaringe	4	3	11,16 y 51	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	1	0	6,11,16,53	4	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,11 y 16	2	0	No E2	Integrado
Hipofaringe	2	3	6,11,16,31	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Orofaringe	2	2b	6,11,16,31	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,16,18,31	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	1	6,16,18,31	4	0	No E2 No E6	NA**
Nasofaringe	3	0	6,11,16,31	ND*	0	No E2 No E6	NA**

En la tabla 15 se pueden observar la carga viral así como el estatus físico del ADN de VPH-16 en muestras de CCECC. Como puede notarse la frecuencia de integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera (incluyendo aquellos casos en los que el ADN viral se encontraba de forma mixto) es alta con un 86% (19/22) de casos integrados y 9% (2/22) en forma mixta, observándose que la orofaringe fue la localización anatómica que presentó en algunos casos el ADN viral de forma mixta o episomal mientras que en el resto de las localizaciones el ADN viral se observó siempre de forma integrada ($p=0,00$).

La carga viral se mantiene con un promedio de 10 copias de ADN de VPH por cada copia de β -globina (rango entre 2 y 20 copias de ADN de VPH). Es importante mencionar que en estadios tempranos de la enfermedad la presencia de mayor número de genotipos dificultó la cuantificación, mientras que en estadios avanzados en los que predominó la infección por el genotipo 16 se detectaron los altos números de copias mientras que en los casos en los que se detectaron tres genotipos virales se observó que la carga viral era menor.

Curvas de sobrevida en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

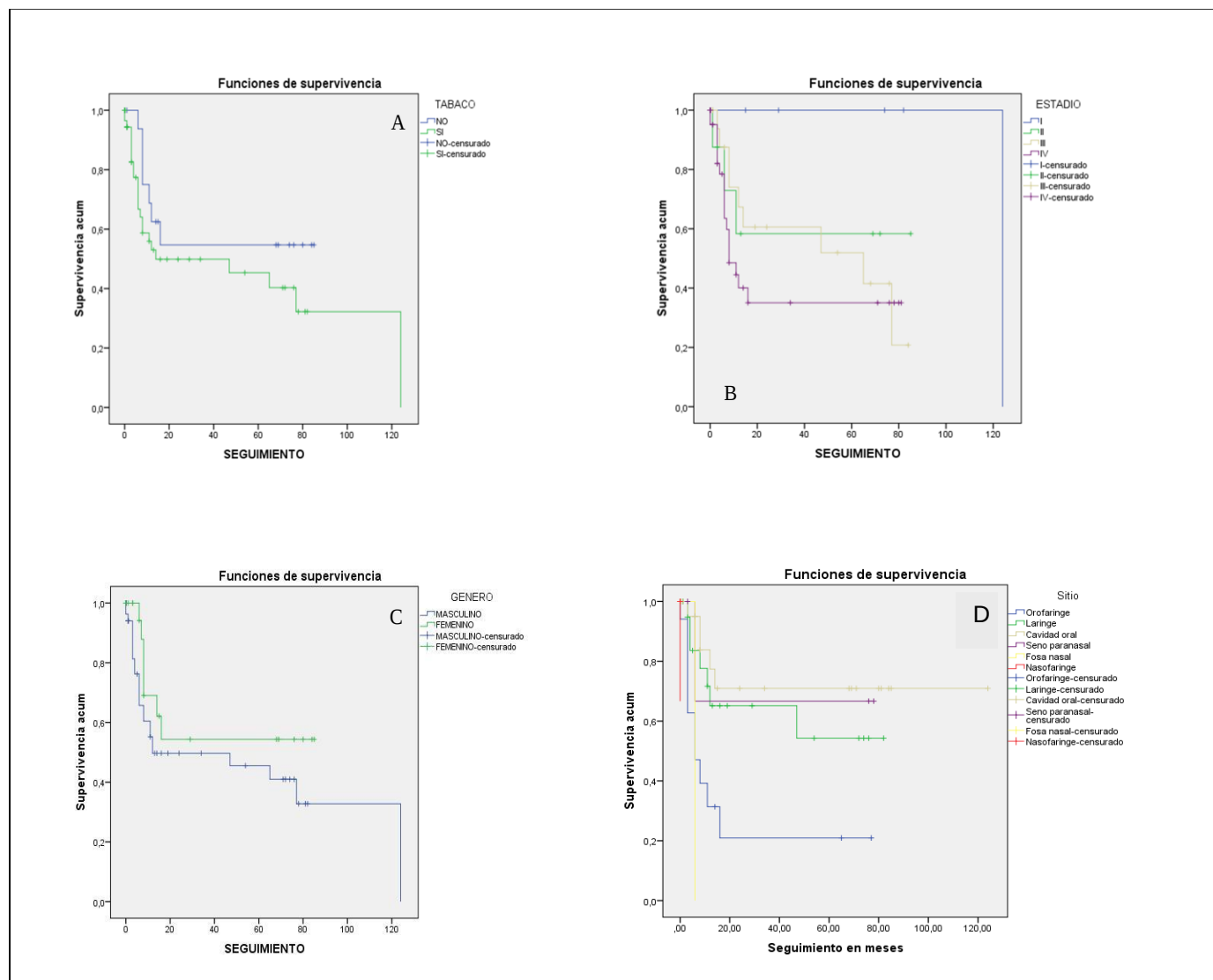


Figura 61.- Curvas de sobrevida de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. A) pacientes con CCECC en relación al consumo de tabaco. B) Pacientes con CCECC respecto al estadio tumoral. C) pacientes con CCECC en relación al género de los pacientes. D) pacientes con CCECC respecto a la localización anatómica del tumor.

La figura 61, muestra los análisis de supervivencia de los pacientes con CCECC respecto a varias de las variables analizadas en esta investigación, entre ellas se encuentran el género el consumo de tabaco y el estadio tumoral, no se encontraron evidencias estadísticamente significativas que permitan concluir que los factores evaluados presentan una relación directa con la sobrevida de los pacientes ($p>0,05$), sin embargo se puede notar en las figuras que los pacientes consumidores de tabaco presentan una menor sobrevida que aquellos pacientes que no son fumadores, igualmente ocurre con el género, los pacientes femeninos tienen una esperanza de vida mayor que los pacientes masculinos; en cuanto al estadio tumoral, en la figura se puede notar que hay una separación entre las curvas a favor de los pacientes diagnosticados en estadios tempranos, indicado una mayor sobrevida ($p>0,05$). Respecto a la localización anatómica del tumor, se puede concluir que aquellos pacientes con carcinoma de células escamosas de la orofaringe son los que presentan una menor esperanza de vida, seguidos de los pacientes con carcinoma de laringe, mientras que la mayor sobrevida se asocia a pacientes diagnosticados con carcinoma de la cavidad oral ($p=0,000$).

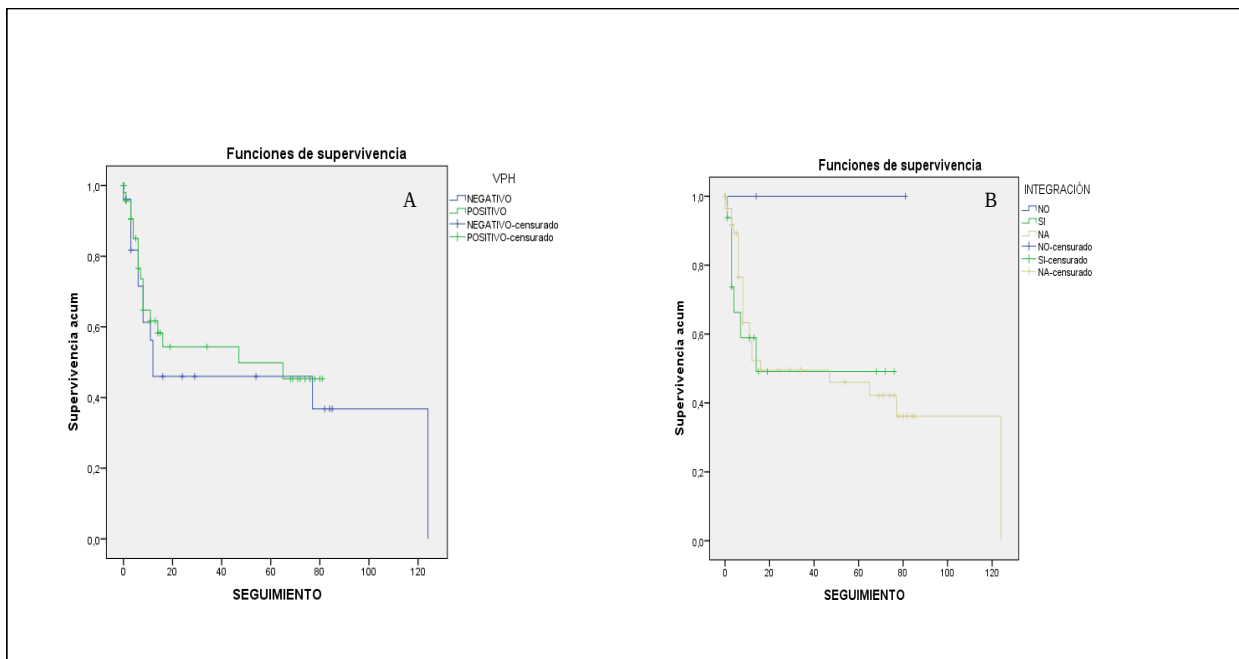
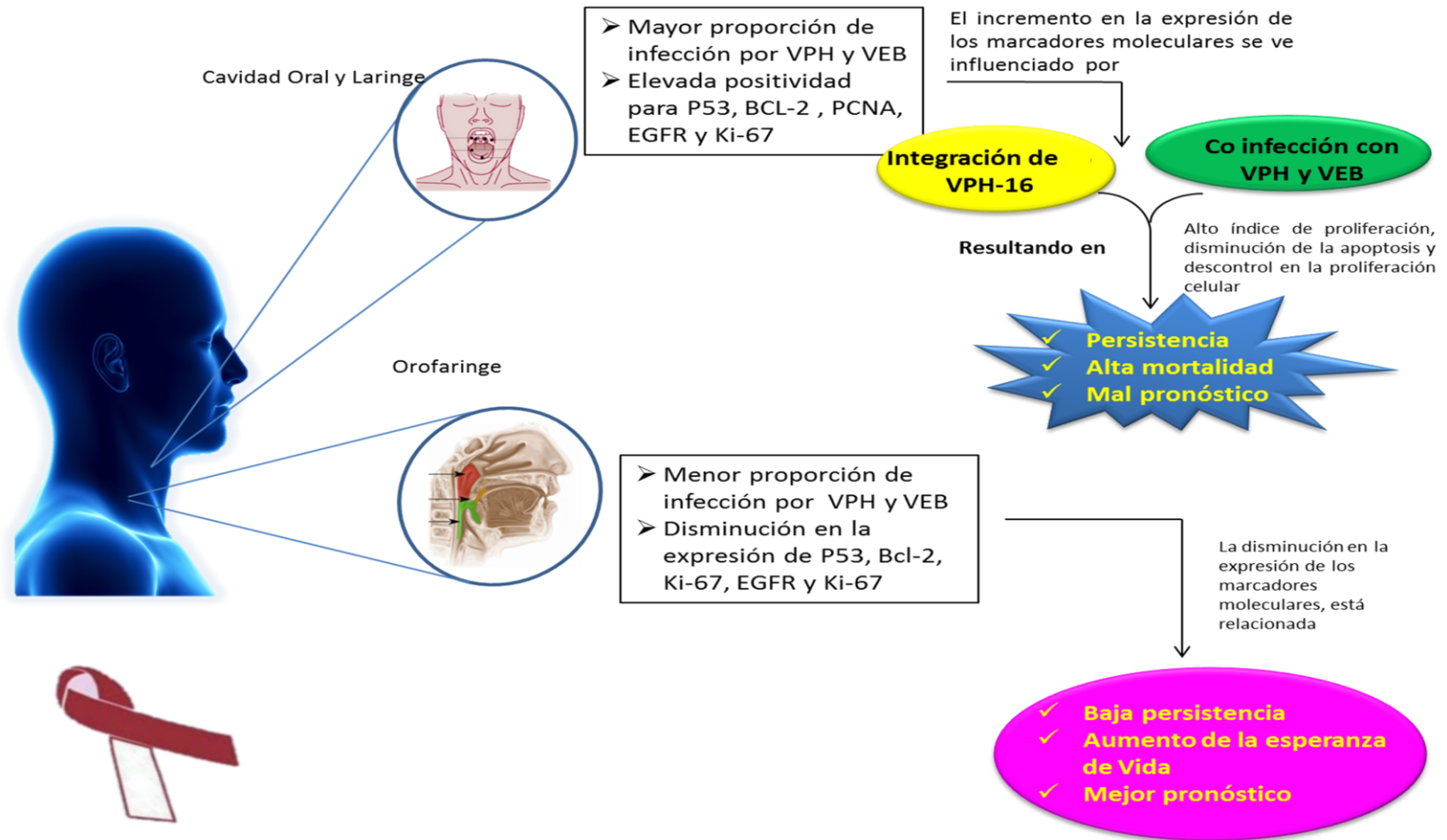


Figura 62.- Análisis de sobrevida de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello en relación a: A) Infección por VPH. B) Integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera ($p > 0,005$).

En la figura 62 se presentan los resultados de sobrevida de los pacientes con CCECC respecto a la infección por VPH, como se puede apreciar los valores de $p > 0,005$, nos indican que no hay una evidencia estadísticamente significativa que permita concluir que la infección viral o que la integración del genoma viral al genoma celular tienen un efecto sobre la sobrevida de los pacientes con CCECC, sin embargo si se observan ambas figuras se puede notar que la infección viral afecta la sobrevida de los pacientes, pues aquellos pacientes VPH negativos tienden a vivir menos que los VPH positivos. Ahora bien, si analizamos la variable de integración en los pacientes VPH positivos se puede apreciar que hay una separación bastante notoria entre ambas curvas (genoma integrado vs genoma no integrado) a favor de los pacientes en los que no había integración.

Infecciones virales y su relación con la expresión de marcadores moleculares en Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del Tumor.



Esquema 2.- Infecciones virales y su relación con la expresión de marcadores moleculares en Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello según la localización anatómica del Tumor.

En el esquema 2 se muestran las relaciones existentes entre las infecciones virales con la expresión de los marcadores moleculares en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, haciendo énfasis en las repercusiones que éstas tienen sobre la sobrevivencia del paciente.

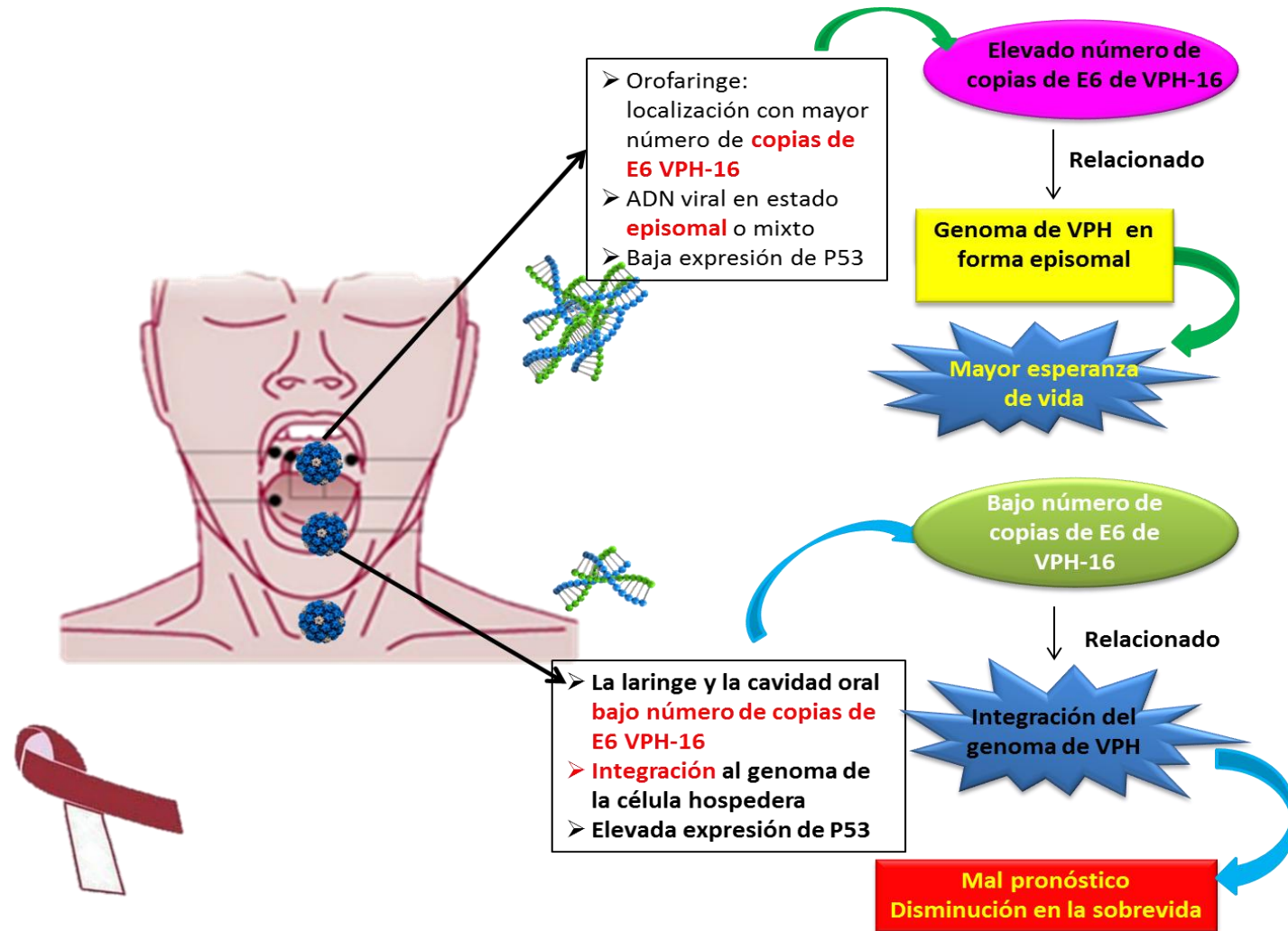
La cavidad oral que fue la localización con mayor proporción de infección por VPH y VEB, en esta localización se pudo observar una mayor expresión de P53, Bcl-2 y Ki-67, los cuales juegan un papel importante en la replicación celular y en la vigilancia de dicho proceso. De forma contraria en la orofaringe la frecuencia de infección por los virus oncogénicos (VEB-VPH) es baja y la expresión de P53, Bcl-2 y Ki-67 disminuye considerablemente respecto a la cavidad oral, indicando que la expresión de estos marcadores se ve alterada por la presencia de coinfección con ambos virus oncogénicos.

Un aspecto importante a resaltar es que la infección por VPH se ha relacionado con una disminución en la expresión de P53 debido a que la oncoproteína E6 de estos virus de alto riesgo oncogénico presenta como actividad característica la degradación de esta molécula, sin embargo en se puede notar que la presencia de otro virus oncogénico como lo es VEB afecta la expresión de este marcador con un incremento en la misma, igualmente hay una disminución en la apoptosis mediada por la sobreexpresión de Bcl-2 y una alta proliferación indicada por la sobreexpresión de Ki-67. Lo que nos muestra que las células tumorales coinfectadas proliferan sin control en el proceso de síntesis de ADN, además de estar inmortalizadas ya que Bcl-2 juega un papel importante en el bloqueo de la apoptosis; estos factores se han relacionado con una alta persistencia de la enfermedad, crecimiento tumoral y una alta mortalidad, es decir que la coinfección con dos virus oncogénicos conllevan a alteraciones moleculares relacionadas con un mal pronóstico para los pacientes con carcinoma de la cavidad oral. En la orofaringe, como ya se mencionó la frecuencia de co infección es

baja y la expresión de dichos marcadores moleculares disminuye considerablemente; la persistencia de la enfermedad se observó en pocos casos, mostrando además un incremento de la sobrevida de los pacientes con CCE en la orofaringe.

En resumen, la coinfección con VPH y VEB se relaciona con alteraciones moleculares y con un mal pronóstico.

Carga de E6 de VPH genotipo 16 en pacientes con Carcinoma de células Escamosas de Cabeza y Cuello



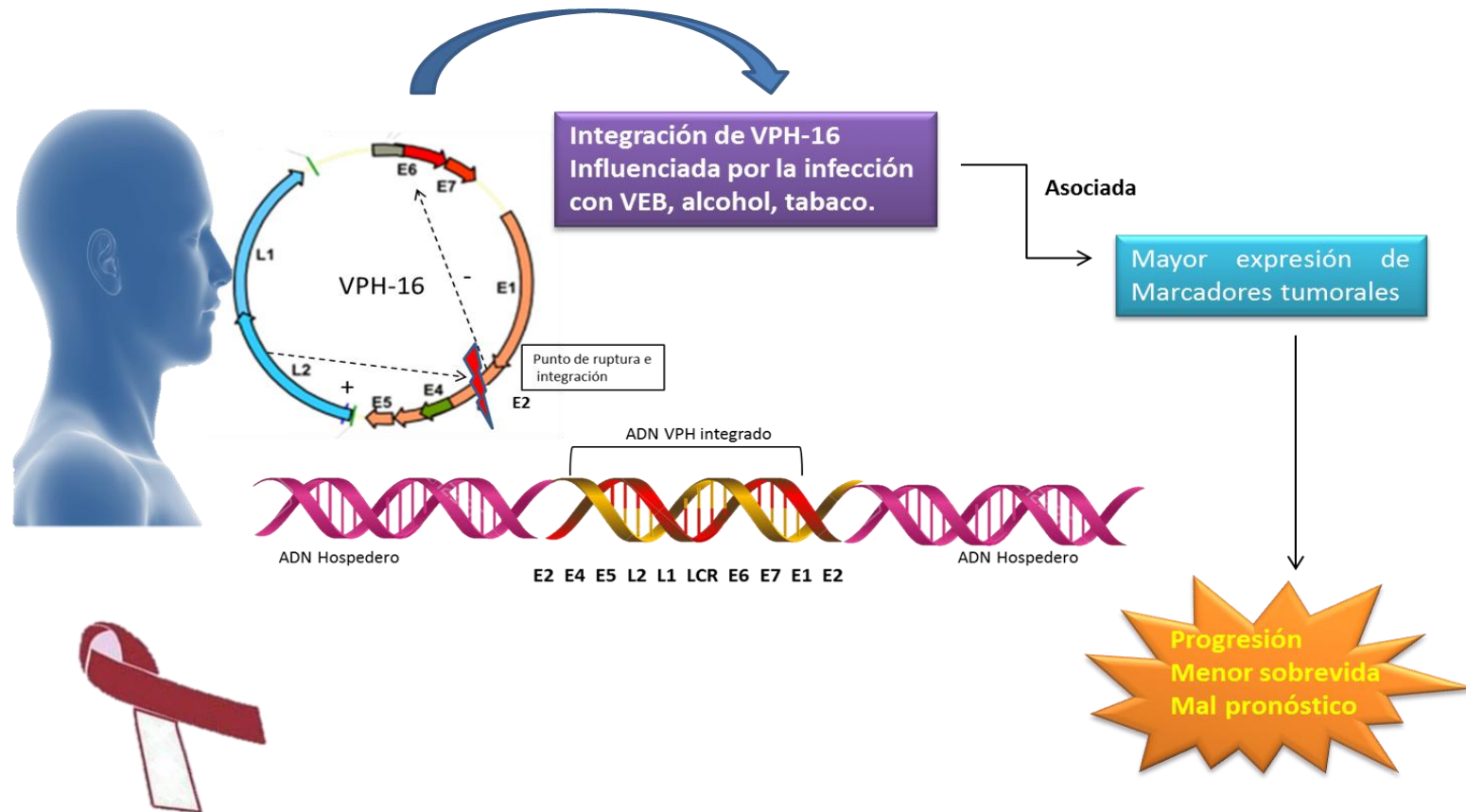
Esquema 3.- Carga de E6 de VPH genotipo 16 en pacientes con Carcinoma de células Escamosas de Cabeza y Cuello.

En el esquema 3 se muestra la relación entre la carga de E6 de VPH genotipo 16 y su relación con la expresión de los marcadores moleculares y la integración en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello. La mayor carga viral se observó en CCE de orofaringe encontrándose en forma episomal o mixta, lo que se relaciona con una baja expresión de P53, lo que no es extraño, pues la presencia de E6 de VPH de alto riesgo se ha relacionado con una disminución de la expresión de dicho marcador, ya que el mismo es degradado vía proteasoma. Un aspecto importante a resaltar es que a pesar de tener un elevado número de copias de E6 la persistencia de la enfermedad se observa en pocos casos y la sobrevida de los pacientes es elevada.

Por el contrario, en los casos de cavidad oral y laringe, la carga viral es baja pero se encuentra integrado al genoma del hospedero, en estos casos la expresión de P53 es elevada; se encuentra una alta tasa de coinfección con otro virus con potencial oncogénico como VEB, la persistencia de la enfermedad es elevada y la sobrevida disminuyó, indicando un mal pronóstico.

La coinfección juega un papel importante pues estudios revelan que la presencia de VEB desencadena en la activación de mecanismos de reparación del ADN así como procesos de alteración cromosomal que pueden contribuir a la integración, por lo que VEB-VPH es requerida para la transformación maligna ya que esta coinfección incrementa el potencial oncogénico de las células convirtiéndose en un factor pronóstico importante, pues aquellos casos con VPH episomal muestran un pronóstico favorable.

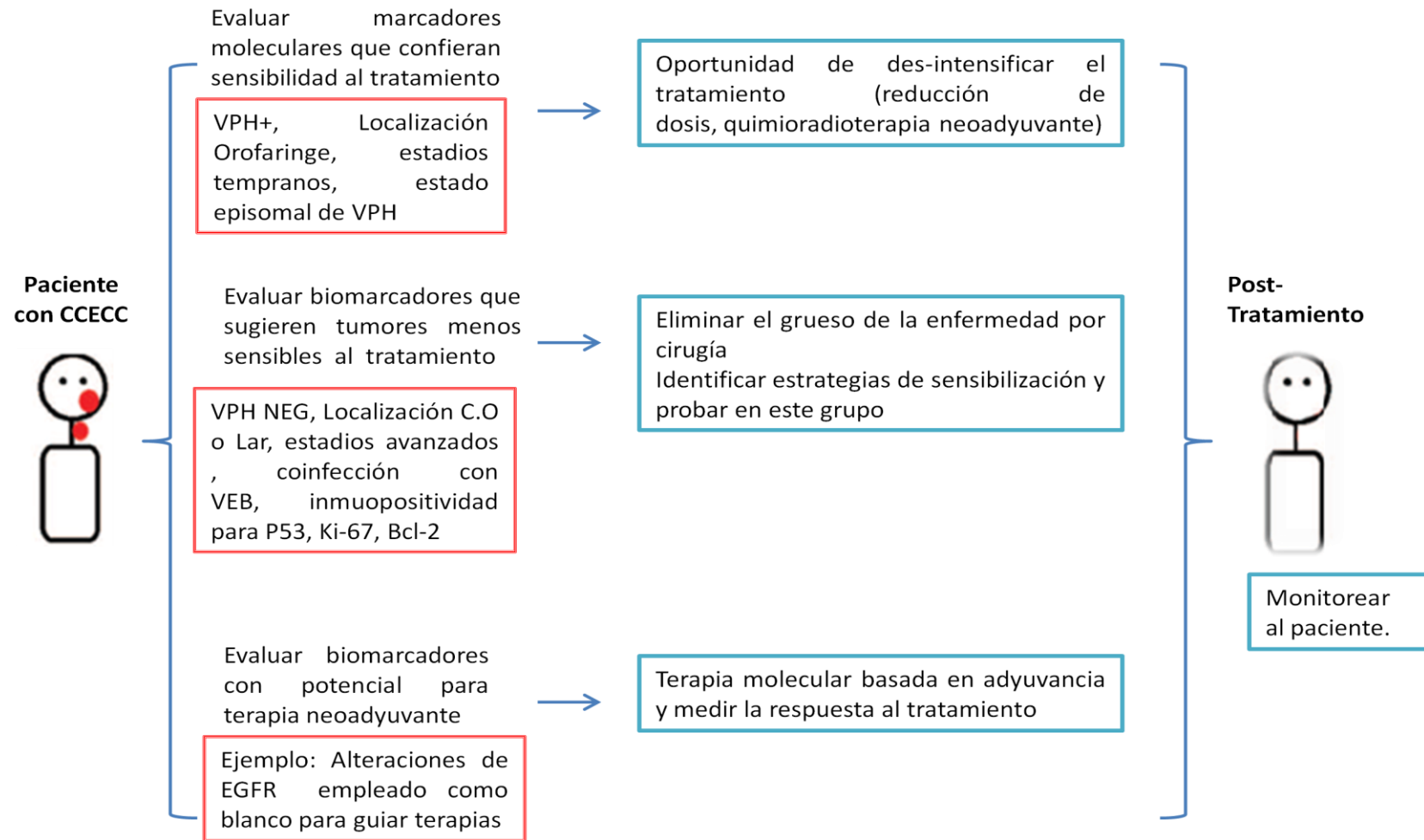
Relación de la integración del genoma de VPH-16 al genoma de la célula hospedera con la expresión de los marcadores moleculares



Esquema 4.- Relación de la integración del genoma de VPH-16 al genoma de la célula hospedera con la expresión de los marcadores moleculares.

En el esquema 4 se muestra el mecanismo de integración de VPH 16 al genoma de la célula hospedera y como esto afectó la expresión de los marcadores moleculares analizados, los resultados de esta investigación arrojaron que la integración del ADN viral es un proceso que se ve afectado por: el número de copias y por la presencia de otros factores como lo son el consumo de alcohol y/o tabaco así como la infección por VEB; este proceso de integración trae como consecuencia un aumento en la expresión de Ki-67 y P53, una mayor progresión de la enfermedad y hecho muy importante como lo es la disminución de la sobrevida de los pacientes, sugiriendo que todos estos factores en conjunto pueden actuar de forma sinérgica en el proceso de progresión de la malignidad.

Propuesta de aplicación de la investigación a la práctica clínica



Esquema 5.- Prpuesta de la aplicación de la investigación en la páctica clínica

En el esquema 5, se muestra la propuesta realizada en la que se vincula la investigación con su aplicación clínica. Allí se indica que aquellos pacientes diagnosticados con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello deben ser sometidos a análisis moleculares en los que se identifiquen marcadores moleculares que le confieran sensibilidad al tratamiento como por ejemplo positividad para el genoma de VPH, localización orofaríngea, estadios tempranos y/o el genoma de VPH de forma episomal, la presencia de estos marcadores le confieren sensibilidad y por lo tanto permite des-intensificar el tratamiento, es decir, reducir las dosis o el empleo de quimio-radioterapia neoadyuvante. De igual manera se pueden emplear biomarcadores de resistencia al tratamiento, como por ejemplo negatividad para VPH, localización tumoral cavidad oral o laríngea, estadios avanzados del tumor, co-infección con otros agentes virales (VEB) o inmunopositividad para uno o más marcadores moleculares, en estos casos la recomendación sería eliminar el grueso de la enfermedad mediante cirugía e identificar estrategias que de des-sensibilización y emplear en este grupo de pacientes. Finalmente se evaluarán también biomarcadores con potencial para dirigir las terapias neoadyuvante, entre ellos la sobreexpresión de EGFR, que es empleado en otro tipo de tumores como blanco para dirigir la terapia. Una vez decidido y aplicado el tratamiento en base a estos marcadores moleculares se debe realizar un seguimiento constante para evaluar la efectividad de los mismos.

Discusión

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello agrupa a aquellos carcinomas que se originan en el tracto aerodigestivo superior, las cuales en conjunto son el sexto en incidencia en los países desarrollados (GLOBOCAN 2002). Se trata de una patología que evoluciona rápidamente y su tratamiento médico quirúrgico conlleva en general una alta morbilidad y disfunción estética.

El carcinoma de células escamosas es el más común de los CCC, la gran mayoría se presenta en varones, siendo la edad de aparición un factor importante (Arias y col. 2007, Veitía y col. 2014); en la presente investigación el promedio de edad se mantuvo dentro del rango descrito, con $60,34 \pm 14.48$ años (rango 19-89), pues de acuerdo con reportes previos este tipo de malignidad se presenta en mayor frecuencia entre la quinta y séptima década de vida, con una media de 62 ± 12 años (Salazar y col. 2014). Sin embargo algunos autores señalan que ocurrirá un aumento en la tasa de incidencia en adultos jóvenes en los años venideros (Majchrzak y col. 2014), lo que puede apreciarse, pues éstas varían entre edades muy tempranas, como 19 años, aunque la predominancia continúa en edades avanzadas. La localización anatómica más frecuente del tumor fue la cavidad oral (33,8%) seguido de la laringe y orofaringe (30% y 22% respectivamente), resultados que son comparables con los de investigaciones realizadas en los que se describe a los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral y de orofaringe como los tipos de CCC más comunes con 263 900 nuevos casos y 128 000 muertes a nivel mundial para el año 2008 (Chai y col. 2015) (Tabla 9). Otro aspecto importante a señalar, es que las muestras evaluadas se encontraban en su mayoría en T3 y T4 (30% y 40% respectivamente) de igual manera los estadios avanzados, EIII y EIV eran los

más frecuentes (27% y 54% respectivamente), lo que no resulta extraño ya que reportes previos mostrados por Mendenhall y col (2006) en el que se analizó 213 pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral, orofaringe e hipofaringe señala que los estados patológicos T3 y T4 son los más frecuentes, pues se observan en 61% de los pacientes, mostrando además que la mayoría de los casos se presentan en EIII (48%) y EIV (38%). En este mismo orden de ideas Acha y col. (2004) señaló que una de las altas tasas de mortalidad asociada a los CCC se debe a que estos se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad por lo que comienzan a tratarse tardíamente conllevando a desenlaces fatales en la mayoría de los casos (Tabla 10).

El desarrollo de estas malignidades está fuertemente unido al abuso en el consumo de alcohol y tabaco (en el 80% de los casos), siendo el factor etiopatogénico más frecuente, así como a una pobre higiene oral y antecedentes familiares (Gillison y col. 2006), sin embargo, existe un incremento en las evidencias epidemiológicas de que hay un sub grupo de estos cánceres que presentan una oncogénesis diferente, las cuales están basadas en la infección por agentes virales como VEB y VPH (De Petrini y col. 2006). En particular, los cánceres de orofaringe VPH positivos, pueden comprender una enfermedad molecular y patológicamente distinta, que es causalmente asociada con la infección viral por lo que ha sido un importante factor de riesgo para el pronóstico y más recientemente para la clasificación y estadiaje de estas malignidades (Fouret y col. 1997; Lydiatt y col. 2017).

Los reportes de la frecuencia de ADN de VPH en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ha variado entre 14 y 60%, dependiendo del sitio del tumor, las condiciones de los pacientes, número de casos incluidos y el método empleado para el análisis molecular

(Weirnik y col. 1991). Mientras que la infección por VEB se ha detectado consistentemente en los carcinomas de estas regiones anatómicas con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la infección y sus efectos son un importante factor epidemiológico.

El 66% de las muestras evaluadas resultó positiva para la presencia del genoma de VPH; siendo el genotipo 16 el más frecuente en forma de infección única (17%). En la tabla 11 se puede notar que la infección por este genotipo ya sea en forma de co-infección o de infección mixta abarca un número considerable de los casos analizados, ocupando un 52,3%, otro aspecto importante que se pudo notar fue que en los estadios iniciales de la enfermedad la frecuencia de infección por VPH es baja (4%) y que ésta va incrementando a medida que se avanza en estadio (55% en estadios avanzados) (Figura 19), igualmente se encontró que es los estadios tempranos las infecciones con múltiples genotipos virales mientras que en estadios avanzados de la enfermedad la cantidad de genotipos fue mucho menor siendo casi exclusivamente genotipos de alto riesgo los que se encontraban presentes, lo cual apoya afirmaciones realizadas en otras localizaciones anatómicas como cuello uterino por ejemplo, en las que se indica que una infección persistente con genotipos de alto riesgo oncogénico, entre ellos VPH-16 con un factor de riesgo importante para la génesis tumoral (Del Río y col. 2015).

En cuanto a la localización anatómica, se observó que la cavidad oral presentó la mayor tasa de infección por VPH (34%) seguido de la laringe (28%) siendo los genotipos 6,16 y 51 los más frecuentes; y la orofaringe (23%) con 22,91% de los casos VPH-16. Investigaciones a nivel mundial describen que los datos de prevalencia de infección por VPH en pacientes con CCECC son bastante amplios, ocupando valores que van desde 57% (Guily y

col. 2011) hasta sobrepasar el 60% alcanzando incluso el 100% (Worden y col. 2008), siendo los genotipos 16 y 18 los que se presentan con más frecuencia, es importante resaltar que los trabajos en los que se ha realizado la detección y tipificación viral en pacientes con esta patología en los que los resultados obtenidos son similares (Koskinen y col. 2003; Guily y col. 2001; Worden y col. 2008), sin embargo datos epidemiológicos revelan que el papel de la infección por VPH en la etiología del CCECC es controversial. También se han detectado genotipos de bajo riesgo oncogénico (VPH-6) en esta investigación, lo cual ha sido descrito por Venuti y col (2000) quienes reportaron la infección por VPH tipo 6 aunque en bajo número de copias, igualmente en una investigación realizada en Venezuela por Veitía y col. (2009) se reportó la infección con este genotipo de bajo riesgo oncogénico en pacientes con CCECC.

Un trabajo de gran interés es el reportado por Breamer y von Bouchwald (2010), quienes analizaron diversas investigaciones a nivel mundial en las que se evaluó la infección por VPH en pacientes con CCECC, en ella se describe que la infección viral en estas malignidades es bastante variable con promedios desde 12% de positividad hasta valores de 93%, indicando que estas diferencias en el promedio de detección se deben básicamente al tamaño de la muestra, tipo de material empleado y a la metodología utilizada para la detección; sin embargo un dato importante en el que concuerdan todas las publicaciones es que la infección por VPH-16 está presente ya sea en forma de infección única o con otros genotipos virales en las muestras de CCECC analizadas, señalando que ésta podría ser un importante factor de riesgo.

En cuanto a las localizaciones anatómicas más frecuentemente infectadas por VPH se puede decir que nuestros resultados son consistentes con publicaciones previas en las que se muestra que las infecciones por este virus han sido propuestas como un factor biológico que juega un papel importante en la carcinogénesis oral, basados en evidencias epidemiológicas y clínico-patológicas (Betiol y col. 2013). En la literatura, el VPH 16 ha sido identificado entre un 29% y 90% de los carcinomas orales (Badaracco y col. 2000, Ringstrom y col. 2002, Correnti y col. 2004, Castillo y col.2011). Interesantemente, las infecciones con VPH de bajo riesgo, 6 y 11 pueden ser también identificados en algunos de estos carcinomas, lo cual se pudo observar igualmente en carcinomas de laringe (Castillo y col. 2011). En la mayoría de los reportes el VPH 16 es indudablemente el genotipo viral detectado con mayor frecuencia, y algunos trabajos proponen que la presencia de este genotipo viral en células exfoliadas de la cavidad oral incrementa 14 veces el riesgo de cáncer de orofaringe (Kreimar y col. 2005).

En este contexto, se ha descrito a nivel mundial que la prevalencia de VPH varía entre 14-57% en casos de cáncer de orofaringe; sin embargo existen reportes con una baja prevalencia de VPH en dos grandes estudios realizados en Europa Central y América Latina en las cuales la prevalencia es de 4,4% en cáncer de orofaringe y 3,8% en cáncer de Hipofaringe/laringe (Betiol y col. 2013). Por otro lado, un trabajo realizado por Syrjänen K (2003), reportó que de 322 carcinomas de senos paranasales analizados, 70 (21,7%) resultó positivo para algún genotipo de VPH, lo cual es comparable con nuestros resultados (Syrjänen K. 2003).

Aunque la relación de VPH con carcinoma de células escamosas de laringe no está bien establecida, se conoce que el epitelio de la laringe es susceptible a la infección por dicho

virus y su presencia ha sido confirmada por tinciones inmunohistoquímicas, demostrando la expresión de proteínas estructurales (Syrjänen. 2005), ubicándose como una infección viral que puede variar entre 5% y 41% en este tipo de carcinomas según datos de diferentes hospitales públicos y privados de Francia (Kreimar y col. 2005). En un estudio realizado por Torrente y col. (2011) reportaron que los carcinomas de laringe son los CCECC más comunes y que el genoma de VPH ha sido identificado en un cuarto de todos los casos evaluados mientras que en la mucosa laríngea normal la incidencia de VPH reportada ha sido de 19%. Esto sugiere que el número de cánceres VPH-positivos observados podrían reflejar la prevalencia de la infección latente en el epitelio de las cuerdas vocales.

En Venezuela, son pocos los estudios realizados al respecto, uno de ellos fue la investigación realizada por Liuzzi y col. (2007), se incluyeron 29 muestras de pacientes con CCECC. La infección viral fue detectada por PCR en 34,48% de estas, la mayoría resultó de bajo riesgo oncogénico. Por otro lado, Jiménez (1998) evaluaron lesiones premalignas de la cavidad oral, reportando la presencia del genoma de VPH, siendo los genotipos 6, 11, 31,16 y 32 los más comunes, mostrando además que estas lesiones son predominantes del género masculino y que además se presentan en la segunda y cuarta década de vida. Veitia y col. (2014), detectaron el genoma viral en 67,6% de las muestras de tumores de CCECC evaluadas, reportando además que el VPH-16 fue el más frecuente siendo la cavidad oral y la laringe las localizaciones anatómicas con mayor positividad para la infección viral.

Como se ha mencionado, la carga viral juega un papel importante ya que se ha relacionado con la integración del ADN de VPH al genoma de la célula hospedera y con respuesta al tratamiento. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la carga

promedio para el gen E6 de VPH-16 en el área de cabeza y cuello es de aproximadamente 10 copias/ β -globina (rango 2-20 copias/ β -globina) siendo la orofaringe la localización anatómica con mayor número de copias (tabla 15) con una relación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el número de copias y la localización anatómica del tumor. Esto es concordante con trabajos previos en los que se describe que la carga viral para este tipo de tumores es variable y que puede encontrarse entre 3.4×10^{-4} hasta valores tan altos como 739 copias/gen de referencia (Speel E. 2017; Koskinen y col. 2003). Si se comparan nuestros resultados con los de otras localizaciones anatómicas como por ejemplo el esófago, se puede decir que los números de copias de E6 son similares, pues reciente evidencia revela que el promedio de carga viral en carcinoma de esófago de VPH-16 se encuentra cercano a $2,55 \pm 3,19$ copias por célula (Zhang y col. 2010), similarmente Si y col (2005) reportan que en China la carga viral promedio varía entre <1 a 157 copias por célula en dicha localización anatómica. En cuello uterino donde la infección por VPH ha sido descrita como un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer, la carga viral ha sido reportada con valores que van desde 32 hasta 1546 copias de VPH-16/célula (Zhang y col. 2010), otros estudios realizados en carcinoma vaginal la carga de E6 varió entre 284 y 667 copias mientras que en carcinoma vulvar el rango de la carga viral es mucho más amplio mostrando valores entre 499 y 1 477 442 copias de E6, valores que son notablemente mucho más altos a los que se reportan en el tracto aerodigestivo superior (Lillsunde y col. 2014).

Como puede observarse en estos reportes, la carga viral no es constante y además presentan diferencias notables entre localizaciones anatómicas, por lo que ha resultado de gran utilidad evaluar la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera ya que estudios previos revelan que el estado del genoma viral (integrado o episomal) es un factor

pronóstico importante, pues aquellos casos con VPH episomal muestran un pronóstico favorable, sugiriendo que la integración podría modificar de alguna forma la biología de los tumores (Mellin y col. 2002). La infección persistente por VPH de alto riesgo puede resultar en la integración del genoma o de partes del genoma, lo que ha sido detectado tanto en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino (Russan y col. 2015), en carcinoma de orofaringe y en displasias adyacentes (Mooren y col. 2014). El 86% de las muestras de CCECC evaluadas en esta investigación presentó integración del genoma viral al genoma de las células hospederas lo que es consistente con otras investigaciones, como la realizada por Olthof y col (2012) quienes indican un alto porcentaje de integración específicamente en la orofaringe (40% - 80%), similarmente Mellin y col. (2002), reportaron que la carga viral es variable en CCC y que una alta carga viral se asocia con un estatus preferentemente episomal que se relaciona significativamente con un mejor pronóstico mientras que cargas bajas se relacionan con integración y mal pronóstico, lo que se observó en la presente investigación, donde aquellos casos en los que la carga viral es menor fue donde se detectó un mayor porcentaje de integración ($p=0,016$) aunque no se encontró relación entre estos parámetro con la sobrevida de los pacientes se puede apreciar que ambos tienen cierta influencia sobre la misma. Las investigaciones al respecto atribuyen estas diferencias al hecho de que posiblemente los pacientes con alta carga viral inducen una mejor respuesta inmunológica contra el cáncer, aunque esta hipótesis no se ha podido confirmar y se requieren más estudios que la apoyen. Es importante mencionar que aunque existen variaciones notables en la carga viral entre las diferentes localizaciones anatómicas, el porcentaje promedio de integración es similar, un ejemplo de ello es la investigación realizada por Groves y Coleman. (2015) en la que se describe que el promedio de integración de VPH-16 se ubica entre 50-80% de los casos

evaluados de carcinoma de cervix. Es importante mencionar que este proceso de integración requiere la ruptura de tanto del genoma viral como del genoma de la célula hospedera y se cree que la tasa de integración es proporcional a los niveles de daños sufridos por el ADN, estos daños se han descrito como endógenos y exógenos, incluyendo el efecto del alcohol y tabaco así como la infección por el propio virus o por otros agentes infecciosos incluyendo otros virus como por ejemplo VEB, esto desencadena en la activación de mecanismos de reparación del ADN así como a procesos de alteración cromosomal que pueden contribuir al proceso de integración (Visalli y col. 2016).

En este sentido se evaluó la infección por VEB en las muestras de CCECC encontrándose que 51,25% de las mismas presentan la infección por este agente, siendo la cavidad oral y la laringe las localizaciones anatómicas más frecuentes (39% y 34% respectivamente), encontrándose la mayoría de ellos en estadio avanzado de la malignidad (49% en estadio IV) y de estos el 32% presentó positividad para ambos virus (tabla 12).

Estos datos son comparables con los resultados de una serie de trabajos donde se ha detectado el genoma viral tanto por inmunohistoquímica como por hibridación y cuyos reportes demuestran una positividad para dicho virus de aproximadamente 50%, que varía según la metodología empleada para su detección (Preciado y col. 1995). Es importante resaltar que se ha especulado acerca de la relación de este agente con la etiología del CCECC, uno de estos casos es un estudio realizado por Oshima y col. (1991) quienes señalaron que el 33% de los carcinomas epidermoide de cabeza y cuello eran positivos para VEB mediante PCR. Trabajos realizados en China demuestran que alrededor del 100% de los carcinomas nasofaríngeos anaplasicos o pobremente diferenciados (los más frecuentes en ese país)

presentan el genoma de VEB y se encuentra en las células epiteliales transformadas. Yang y col. (2001) por su parte realizaron la detección de VEB mediante hibridación in situ de la proteína EBER, revelando que la infección viral estaba presente en 71,1% de los carcinomas de nasofaringe, y en bajas proporciones en carcinoma de orofaringe, hipofaringe y laringe. El marcaje, se localizó específicamente en células malignas, mientras que el estroma circundante y las células normales eran consistentemente negativas para la infección por VEB, sugiriendo que dicha infección podría tener un papel importante en la génesis o progresión tumoral

En nuestro país son pocos los estudios de este tipo que se han llevado a cabo, uno de ellos fue realizado por Ponce y col. (2008) en el cual se evaluaron 31 muestras de pacientes de tumores malignos localizados en el tracto aerodigestivo superior empleando técnicas de biología molecular, obteniendo que 41,9% de estas eran positivas para el genoma del VEB siendo la laringe la localización anatómica con mayor positividad; similarmente Veitía y col. (2015) encontraron 44% de positividad para VEB, siendo la cavidad oral la localización anatómica con mayor frecuencia de infección (40%). Estos resultados apoyan los obtenidos en este trabajo, abriendo las posibilidades para futuras investigaciones en las que se analice el comportamiento de la población venezolana ante este tipo de infección, así como la relación que pudiera existir entre la infección por VEB y el desarrollo de CCECC. Al evaluar las diferentes relaciones entre las infecciones por VPH y VEB no se hallaron valores estadísticamente significativos, sin embargo se pudo notar que cuando estaba presente la infección por VEB la tendencia de integración del genoma de VPH era mayor que cuando este no estaba presente ($p > 0,05$), lo que apoya la hipótesis propuesta por Visally col. (2016). Pocos son los trabajos que se han realizado al respecto y los existentes muestran en algunos casos resultados controversiales Deng y col. (2014) investigaron acerca de la prevalencia de la

infección por VPH y VEB así como el valor pronóstico de esta infección en pacientes Japoneses con Carcinoma de Cabeza y Cuello, los resultados arrojados muestran que sólo un 1% de los pacientes con CCC presentaron co infección indicando que es raro encontrar ambos virus en este tipo de pacientes. De manera contraria en 2015 Jiang y col. evaluaron si la co-infección de VPH y VEB es requerida para la transformación maligna y si esta co infección incrementa el potencial oncogénico de las células, para ello emplearon un modelo in vitro de células cancerosas FaDu y normales NOK, en las cuales se imitó el entorno de coinfección (sobre expresión de E6 y E7 de VPH integración del ADN viral al hospedero e infección por VEB), los resultados obtenidos por los autores señalan que ambas líneas celulares mostraron un significativo incremento en la invasión en ausencia de cualquier efecto en la proliferación, sobre lo que especulan indicando que la razón de que los tumores VPH positivos tengan más progresión se debe a la coinfección de estos virus ya que se ha observado que pueden tener un efecto más profundo sobre la invasión que la proliferación. En este mismo orden de ideas, Veitia y col. (2017) evaluaron la coinfección por VPH/VEB en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral reportando un 48% de co infección y que la misma es mayor en estadios avanzados de la enfermedad (EIII y EIV) sugiriendo que el papel de estas infecciones virales tengan un papel más importante en la progresión que en la génesis tumoral.

Además de la detección de agentes infecciosos en CCECC mediante el empleo de técnicas moleculares, en este estudio se hizo uso de otras herramientas que en combinación con la ya mencionada permite establecer un mejor pronóstico, evolución y tratamiento de este tipo de cáncer, basadas en la evaluación de moléculas producidas o inducidas por las células neoplásicas denominados marcadores moleculares; en el presente trabajo se estudiaron a las proteínas P53, PCNA, Ki-67, Bcl-2 y EGFR.

Existen reportes donde se menciona al marcador molecular P53 como la mutación más frecuentemente encontrada en tumores humanos (Lane 1992, Vogelstein y Kinzler. 1992); en otros tipos de cáncer más estudiados como, por ejemplo, el cáncer cervical, la presencia de P53 en el núcleo de las células es frecuente y los resultados son heterogéneos, ya que la expresión varía entre los diferentes estudios desde un porcentaje bajo hasta un 62% (Tjalma y col. 1999. Crawford y col. 1998). En el presente estudio se encontró que el 41,25% de los pacientes con CCECC evaluados resultaron positivos para la detección de P53 (Tabla 13). La localización anatómica que presentó mayor frecuencia fue la cavidad oral con 36,36%, seguido por la orofaringe con un 27,27%, la laringe con 21,21%; mientras que el menor porcentaje de positividad se observó en senos paranasales (6,06%), fosas nasales (6,06%) y nasofaringe en un 3,03% (figura 24). Además, es importante destacar que el 66,6% de los tumores inmunopositivos se encontraba estadio IV (a y b) la tinción para P53 se encontró en las células tumorales más no en las células epiteliales normales (figuras 20,21, 22 y 23). Un resultado importante fue que el 18% de los casos con mutaciones en P53 era también VPH positivo ($p>0,05$).

Estos resultados son comparables con los de otros trabajos realizados, uno de ellos fue llevado a cabo por Haraf y col. (1996), donde se evaluaron 66 muestras de pacientes para detectar alteraciones de *P53* mediante secuenciación de los exones 5-11 de dicho gen, hallando que el 24% de las muestras presentaba algún tipo de anomalía siendo la cavidad oral la localización anatómica con una mayor tasa de mutación, seguida de la laringe y la orofaringe (28,5%, 26,3% y 15,4%). Contrariamente, Golusinski y col (1998), encontraron un que la laringe presenta alta tasa de mutación para P53 (70%). De manera similar otros autores

describen mutaciones en pacientes con carcinoma de laringe e hipofaringe entre 50% y 68% (Pruneri y col. 1997; Xie y col. 1997).

Por otra parte, se ha reportado que en numerosos tumores humanos hay una sobre expresión de Bcl-2 y se piensa que esto puede contribuir a la progresión del tumor y un incremento en la resistencia a las drogas utilizadas (Elzagheid y col. 2006). En esta investigación se ha detectado la expresión de Bcl-2 en el 33,75% de los casos (Tabla 13), siendo la laringe y la cavidad oral las localizaciones anatómicas con mayor expresión del marcador, 33,30% (figura 30). La mayor inmunopositividad se encontró principalmente en las células tumorales (figura 29) y en tumores en estadio IV (55,5%), siendo el 74% de estos casos VPH positivos ($p=0,004$).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por algunas investigaciones en las que Michaud y col. (2009), evalúan la expresión de los miembros de la familia Bcl-2, así como la relación que dicha expresión guarda con el pronóstico de los pacientes. Reportando un 29% de positividad para la expresión de Bcl-2 indicando que aquellos pacientes Bcl-2 inmunopositivos presentan un riesgo elevado de falla en el tratamiento, mostrando que esta prueba pre tratamiento podría predecir la respuesta al mismo y además ayudar a personalizar la terapia (Michaud y col. 2009; Tracy y col. 2014). Es de destacar que la expresión de Bcl-2 se asocia con la exposición a factores de riesgo, específicamente al tabaco, lo que se traduce en menores respuestas al tratamiento de radioterapia y tumores más agresivos. De hecho se estima que la recurrencia y muerte es más alta en pacientes Bcl-2 positivos que Bcl-2 negativos (Gallo y col. 1996).

Otro de los marcadores analizados en este trabajo de investigación fue la molécula de proliferación celular Ki-67, el cual ha sido descrito como uno de los primeros antígenos nucleares humanos empleado como marcador pronóstico, que se expresa en las fases activas del ciclo celular. Aunque el papel de Ki-67 no está todavía claro, hasta ahora se considera como uno de los marcadores de proliferación más confiables (Cordes y col.2009).

El 17,5% de los tumores evaluados eran inmunopositivos para Ki-67 ($p=0,000$) (Tabla 13), siendo la cavidad oral y la orofaringe las localizaciones anatómicas con mayor positividad (50% y 21,40% respectivamente) (figura 44). Por otro lado se puede observar que la positividad era mayor en tumores en estadios IV (85,7%). Actualmente existen estudios donde se muestra que un alto porcentaje de Ki-67 con un patrón de tinción al azar involucra un grupo de células tumorales altamente proliferativas las cuales pueden ser más agresivas; en trabajos realizados con tumores de la cavidad bucal se ha argumentado que un alto porcentaje de células teñidas para ki-67 se puede correlacionar con una respuesta nula a la quimioterapia (Couture y col. 2002), sin embargo en cáncer de cabeza y cuello los reportes han sido contradictorios, algunos estudios muestran que no hay correlación de la actividad proliferativa con la expresión del marcador; mientras que otros estudios como por ejemplo el realizado por Pulkkinen y col (1997) se le atribuye su bajo porcentaje de tinción a problemas con el procedimiento empleado, por otro lado Hagedorn y col (1998) encontraron una relación estadísticamente significativa de la expresión de Ki-67 con la actividad proliferativa y pronóstico; observándose un incremento de la expresión del antígeno nuclear en combinación con la disminución de la diferenciación, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo.

Se evaluó también mediante inmunohistoquímica la expresión de PCNA o Antígeno Nuclear de Proliferación Celular, el cual ha sido estudiado en muchas neoplasias, demostrándose que el índice proliferativo se correlaciona con la prognosis en Linfoma de Hodgking, cáncer gástrico (Sarc y col. 1998), cáncer de mamas (Tahan y col. 1993), cáncer de ovario (Hatmann y col. 1992) y cáncer de faringe (Pich y col. 1992).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el 72,25% de los pacientes evaluados presentaron inmunopositividad para PCNA ($p=0,000$) (Tabla 13), siendo la laringe, la cavidad oral y la orofaringe las localizaciones anatómicas que presentaron mayor positividad (31,6%; 28,10% y 26,32% respectivamente) (figura 38). Siendo los estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) los que presentaron mayor inmunopositividad (58,7%). Se ha descrito previamente que la tinción para PCNA abarca un aproximado de 74% de los casos evaluados, siendo los tumores de grado III los que presentan una mayor expresión de PCNA (Sarac y col.1998). También ha sido relacionado con la metástasis en carcinoma laríngeo, reflejo de ello es un estudio realizado por Kupisz y col (2010) donde se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de PCNA en tumores primarios y ganglios metastásicos de pacientes, hallando 100% de inmunopositividad tanto en los tumores primarios como en los ganglios, mostrando así que una evaluación de este marcador podría ser de utilidad para medir la agresividad del tumor y la posibilidad de desarrollar metástasis, ya que el porcentaje de células inmunopositivas para PCNA es significativamente más alto en aquellos tumores primarios que se asociaban a metástasis que aquellos sin metástasis.

Por último pero no menos importante, se realizó la evaluación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual es miembro de la familia de receptores

transmembrana tipo tirosina quinasa que ha sido asociado con efectos negativos en la progresión del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, movilidad celular tumoral y metástasis, y correlacionado con mal pronóstico en tumores de cabeza y cuello. Sin embargo los reportes son contradictorios, ya que algunos han mostrado que una alta expresión de EGFR se asocia con un baja supervivencia libre de enfermedad mientras que otros no han encontrado correlación entre la expresión y supervivencia (Kumar y col. 2009).

En el presente estudio el 46,25% de los casos de CCECC evaluados presentaron inmunopositividad para EGFR ($p=0,502$), siendo la laringe la localización anatómica que presentó una mayor expresión de dicho marcador (35,10%), seguido por la cavidad oral con 27% de positividad y la orofaringe con 21,60% de los casos evaluados (figura 52). Con respecto al estadio tumoral, se pudo observar que en el estadio IV (60%) la inmunopositividad era mayor que en los estadios I y II.

Estos resultados concuerdan con los reportados en un estudio realizado por Quon y col. (2001) quienes señalan que la expresión de EGFR se describe entre un 42% a un 80% de los casos de CCECC estudiados; de igual manera Weg y col. (2005) reportan inmunopositividad para dicho marcador dentro mismo rango, muestran además que la localización anatómica con mayor expresión es la cavidad oral con un 100% de los casos estudiados, seguido de la laringe con 38% y la faringe con 43%. Se han realizado estudios que reportan una mayor sobreexpresión de EGFR, pero los valores no están muy alejados de los mencionados en esta investigación, ejemplo de ellos es una investigación desarrollada por Sweeny y col. (2012) quienes realizaron un estudio retrospectivo con 56 pacientes donde EGFR se encontró sobreexpresado en 56% de los tumores primarios evaluados; Jimenez y col (2013) mencionan

que EGFR se sobreexpresa entre 80%-100% de los pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y que de forma similar actúa en la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, aumento de la movilidad celular y estimulación de la angiogénesis, en síntesis favorece la formación de un “fenotipo metastásico”, hipótesis con la cual concuerdan Ang y col. (2002) quienes reportaron una variación en la expresión EGFR, y aunque no encontraron relación entre la expresión de dicho marcador con el tamaño y estadio tumoral se detectó una elevada expresión a medida que avanza la lesión por lo que consideran a aquellos tumores que presenta una sobreexpresión de EGFR como más agresivos. Como se puede observar en algunos de los estudios mostrados, la expresión de EGFR en este tipo de tumores es más o menos constante y descrita como un factor importante que contribuye al crecimiento y división celular, lo que podría contribuir a la progresión tumoral y a la resistencia al tratamiento empleado, esto ha hecho que actualmente sea considerado un marcador pronóstico que puede jugar un papel importante en la selección de la terapia a emplear.

En vista de los hallazgos y de la importancia que ha venido cobrando el estudio de las infecciones virales en la carcinogénesis, se evaluó la relación existente entre la integración del ADN de VPH al genoma de la célula hospedera con la expresión de los marcadores moleculares; los resultados arrojaron una relación estadísticamente significativa entre la integración de VPH y la expresión de Ki-67 ($p=0,009$) y P53 ($p=0,049$); lo que es de gran interés pues estudios moleculares han aportado evidencias de que el VPH puede tener uno o más sitios de integración (Hu y col. 2015), los cuales parecieran estar distribuidos a lo largo del genoma y se encuentran generalmente cerca o dentro de sitios frágiles del genoma celular (Partenov y col. 2014; Hu y col. 2015). Los cuales se encuentran mayoritariamente en regiones de microhomología entre el genoma viral y el genoma hospedero, indicando que

puede ocurrir una fusión entre ellos al momento de reparaciones al ADN. Partenov y col. (2014) han reportado que para la orofaringe aproximadamente el 54% de los sitios de integración de VPH se encuentran dentro de genes conocidos, Similarmente Olthof y col (2012) identificaron 29 sitios de integración para VPH-16, de los cuales 17 presentaban un papel importante en la génesis tumoral entre los que se describen miembros de la familia P53 y Bcl-2. Estudios en otras localizaciones, como el cuello uterino han permitido identificar que en esa localización existen también puntos de integración a lo largo del genoma (Chandrani y col. 2015) especialmente en genes como MYC, ERBB2, TP63, entre otros (Ojesina y col. 2014). Lo cual ha sido consistente tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares.

Analizando la sobrevida de los pacientes relacionada con cada una de las variables se pudo notar que la localización anatómica del tumor, pertenecer al género masculino, el incurrir en prácticas de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco, así como un diagnóstico en estadios avanzados, tienen influencia en la sobrevida de los pacientes, disminuyendo la esperanza de vida de los mismos. Igualmente se pudo notar que los pacientes que presentan infección por VPH tienen una sobrevida ligeramente mayor respecto a los pacientes VPH negativos sin embargo la integración del genoma viral sería el factor determinante, pues en aquellos casos en los que el genoma de VPH-16 se encontraba integrado la sobrevida es significativamente menor que en aquellos casos en los que no lo estaba.

La relación entre la infección por VPH, VEB y los marcadores moleculares no está del todo clara, ya que como puede verse los estudios realizados son variables en cuanto a los resultados obtenidos y en muchos casos contradictorios, sin embargo la mayoría de ellos concuerdan en el hecho de que un factor por sí solo no es suficiente para predecir la tendencia

de los resultados a los tratamientos; pero que la combinación de dos o más factores podría ayudar a establecer la terapia más adecuada así como predecir la supervivencia libre de enfermedad y la sobrevida promedio de los pacientes.

Conclusiones

- Un alto porcentaje (66%) de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello presentó la infección por VPH, siendo la Cavidad Oral, la Orofaringe y la Laringe las localizaciones anatómicas más frecuentes con la infección
- El VPH 16 fue el genotipo que se detectó con mayor frecuencia en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.
- La carga viral promedio del gen E6 de VPH-16 fue de 10 copias/ β -globina (2-20 coipas por cada gen de referencia).
- La integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera se observó en la mayoría de las muestras VPH-16 positivas (86%)
- La infección por Virus Epstein-Barr se detectó en la mitad de los pacientes evaluados, siendo la cavidad oral la localización anatómica con mayor frecuencia de infección, seguido de la laringe y la orofaringe.
- Los estadios avanzados de la enfermedad presentaron mayor frecuencia de infección por VEB y VPH que los estadios tempranos.
- El 41% de las muestras evaluadas resultaron inmunopositivas para P53, la cavidad oral fue la localización anatómica con mayor inmunopositividad. El marcaje se observó principalmente en el núcleo de las células tumorales con moderada extensión e intensidad.
- El 72% de las muestras evaluadas resultó PCNA positivo, la localización anatómica del tumor con mayor frecuencia de inmunopositividad fue la laringe, el marcaje se observó en el núcleo de las células tumorales con moderada extensión e intensidad.

- El 17% de los pacientes evaluados presentó inmunopositividad para Ki-67, siendo la cavidad oral la localización anatómica con mayor frecuencia de positividad. El marcaje se observó en el núcleo de las células tumorales con una intensidad y extensión débil.
- La cavidad oral fue la localización anatómica con mayor frecuencia inmunopositividad para Bcl-2, el marcaje se observó en el citoplasma de las células tumorales en su mayoría con una débil intensidad y extensión, relacionándose con la persistencia de la enfermedad.
- La laringe fue la localización con mayor frecuencia de inmunopositividad para EGFR. No se observó relación con la persistencia de la enfermedad.
- La co infección por VPH y VEB fue frecuente en paciente con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y la laringe, fenómeno que se relaciona con la integración del genoma de VPH así como con la expresión de P53, Ki-67 y Bcl-2; lo que desencadena en una elevada persistencia de la enfermedad, una alta mortalidad asociada y un mal pronóstico
- Un elevado número de copias de E6 VPH-16 se encontró principalmente en carcinoma de orofaringe, se relaciona con un estatus episomal, y una mejor esperanza de vida
- Un bajo número de copias de E6 VPH-16 está relacionado con la integración del ADN viral al ADN hospedero, lo que lleva a la disminución de la sobrevida y mal pronóstico.
- Existe una relación entre el género, edad consumo de tabaco y estadio de diagnóstico con una disminución en la sobrevida de los pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

ANEXOS

ANEXO 1: Evaluación de las infecciones virales y de la expresión de los marcadores tumorales en muestras de pacientes sanos (n=20)

	Cantidad de pacientes (%)
Edad promedio	
22±4,15	
Rango 16-33	
Género	
Femenino	55
Masculino	45
Consumo de Alcohol	
Si	90
No	10
Consumo de tabaco	
Si	10
No	90
Infección por VPH	
Positivo	30
Negativo	70
Genotipos de VPH	
51	17
6 y 51	83
Carga viral	
E6	ND
E2	NR
Infección por VEB	
Positivos	0
Negativos	100
Marcadores moleculares	
P53	0
PCNA	0
Ki-67	0
Bcl-2	0
EGFR	0

ND: No detectada, NR: Norealizada

Se evaluaron 20 muestras de pacientes sanos que asistieron al postgrado de cirugía de la facultad de odontología de la UCV para extracción de terceros molares retenidos de los cuales se tomó una porción del trígono retromolar. El promedio de edad de los mismos fue de 22 años, con predominancia del género femenino (55%), alto porcentaje de los pacientes eran consumidores de alcohol (90%) mientras que el consumo de tabaco se observó solo en el 10%

de los pacientes. En cuanto a la infección por VPH se obtuvo un porcentaje de infección de 30%, con predominancia de la infección por los genotipos 6 y 51 (83%). Un dato a resaltar es que la carga viral no pudo ser detectada. El 100% de los casos resultó negativo para la infección por VEB.

Los marcadores moleculares evaluados resultaron negativos para todas las muestras.

ANEXO 2: Consentimiento informado y Encuesta

Consentimiento Bajo Información Para la Participación en el Protocolo de Investigación:

Evaluación de la expresión de marcadores tumorales y de la infección por Virus Papiloma Humano y Epstein-Barr en la etiología del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.

Primera Parte: De la descripción de la propuesta de investigación

1.- El Virus de Papiloma Humano (VPH) representa hoy en día la primera causa de infección por transmisión sexual de origen viral en nuestra población. Según investigaciones, esta infección junto con el Virus de Epstein-Barr (VEB) están relacionadas con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello por lo que el siguiente protocolo de investigación tiene como objetivo fundamental evaluar la presencia del Virus de Papiloma Humano y del Virus de Epstein-Barr como agentes etiológicos del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en 150 pacientes que acudan de manera espontánea e independiente a la consulta de cabeza y cuello del Hospital Oncológico “Padre Machado” mediante técnicas de biología molecular e inmunohistoquímicas. Los resultados generados, serán manejados con hermetica confidencialidad y en el caso de algún tipo de infección los médicos que participen en el estudio, realizarán una junta médica para sugerir el tratamiento médico, farmacológico pertinentes a los fines de brindar un beneficio directo al paciente afectado.

Objetivos específicos de la investigación

- Detectar el genoma de VPH en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- Realizar la genotipificación de aquellas muestras que resultaron positivas para la presencia del genoma viral.
- Evaluar la carga viral del VPH en las muestras positivas para virus de alto riesgo oncogénico.

- Evaluar la integración del genoma viral al genoma celular mediante el análisis de la ruptura del gen E2 del VPH genotipo 16.
- Detectar el genoma del virus de Epstein-Barr en muestras de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- Evaluación de la expresión de marcadores de proliferación celular (PCNA y Ki-67) y de oncogenes (P53 y Bcl-2) en muestras de pacientes con CCC mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Evaluación de la expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Relacionar el estadio tumoral con la presencia del genoma del VPH y VEB.
- Relacionar la infección viral con la variación en la expresión de los marcadores tumorales.

2.- A continuación, se presenta la descripción detallada del procedimiento de investigación, especialmente los aspectos significativos que pudiesen afectar su disposición a participar, tales como riesgos físicos, incomodidad o experiencias desagradables.

Historia Clínica

Se realizará una encuesta médica con formato de historia clínica para recolectar datos personales, familiares, epidemiológicos y clínicos (anexo 1). La información contenida en esta historia clínica es absolutamente confidencial y el grupo de médicos y de investigadores asume el total compromiso de confidencialidad y secreto médico de acuerdo a los códigos deontológicos.

Toma de Muestra

Las biopsias serán recolectadas mediante un procedimiento quirúrgico, bajo anestesia total. Una vez extraído el tumor, un segmento de este será cortado en tres fragmentos, uno de ellos empleados para el análisis histopatológico, otro será congelado para los ensayos de biología

molecular y el otro fragmento será embebido en parafina para los análisis Inmunohistoquímicos.

3.- Plan de Trabajo

Fase 1: Recopilación de los datos clínicos y recolección de las primeras biopsias. Procesamiento de las mismas en cuanto a análisis anatomopatológicos, detección y tipificación viral de aquellos agentes infecciosos considerados como cofactores en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello, así como la detección de marcadores moleculares.

En resumen, todo paciente que, como usted, consienta su participación en este estudio será evaluado desde el punto de vista molecular e histológico, a los fines de llevar un control estricto de la infección por VPH y VEB como agentes etiológicos en el CCC.

4.- Por toda incomodidad que resulte en la aplicación de la historia clínica y/o la toma de la muestra, el paciente tendrá absoluto derecho a reclamarla y exigir los correctivos que haya lugar. Podrá presentar su queja ante los responsables del proyecto de investigación, **Lic. Dayahindara Veitía y Dra. María Correnti (Lab. de genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología-MPPS. Tlf: 0212-6050647) y Dr. Juan Liuzzi (Servicio de Cabeza y Cuello, Hospital Oncológico “Padre Machado”. Tlf: 0414-6053436).**

5.- Este estudio no comprende pruebas con fármacos ni procedimientos quirúrgicos que no sean requeridos por el personal médico responsable para tratamiento de la enfermedad o extirpación del tumor.

6.- Su participación es voluntaria y puede, con todo su derecho, tomar la decisión de retirarse en cualquier momento de la investigación sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.

7.- Los beneficios esperados como resultado de la investigación consiste en el diagnóstico de VPH y VEB como posible cofactores en el desarrollo de CCC para un mejor pronóstico y tratamiento de la malignidad. En caso de requerir tratamientos adicionales será debidamente informado por el Dr. Juan Liuzzi ante los médicos tratantes.

8.- Todos los datos, especialmente los publicados al término de la investigación, mantendrán el compromiso de confidencialidad y sin causar identificación o daño personal.

9.- El proceso de información será continuo, de acuerdo con las características de la investigación, a fin de que el participante pueda evaluar los hechos de la investigación.

10.- El participante estará amparado por: La constitución de la República Bolivariana de Venezuela, la ley del código civil, ley de ejercicio de la medicina y en caso de ser menor de edad por la ley orgánica para la protección de niños, niñas y adolescentes.

11.- El artículo 50 de la Lopna sobre salud sexual y reproductiva indica que los y las adolescentes mayores de catorce (14) años de edad tienen derecho a solicitar por si mismo y recibir estos servicios.

12.- Los resultados será guardados con estricta confidencialidad y serán suministrados al paciente. En calidad de paciente voluntario se podrá retirar del estudio en el momento que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.

13.- El protocolo de investigación se realizará en un número total de 200 pacientes y tendrá una duración de dos (2) años.

14.- Auditores y algunas autoridades debidamente identificadas tendrán acceso a su historia clínica para la verificación de procedimientos y/o datos, sin violar su confidencialidad.

Segunda Parte: de la comprensión del proyecto de investigación por parte del participante.

Declaro haber comprendido el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación **“Evaluación de la expresión de marcadores tumorales y de la infección por Virus Papiloma Humano y Epstein-Barr en la etiología del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello.”**. Enmarcado en los proyectos FONACIT 2005000408 y 2011000413, los cuales consisten en estudios clínicos que servirán para establecer la relación entre ciertos agentes infecciosos y el desarrollo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello mediante métodos moleculares.

Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así lo declaro y firmo a los ____ días del mes de _____ del año 20____.

Nombre y Apellido

Firma de la paciente

Huella Digital si no sabe escribir ó tiene algún
Identidad

Cédula de

Impedimento para firmar

Se hacen dos copias del mismo documento.

Tercera Parte: del consentimiento definitivo para formar parte del proyecto de investigación por parte del participante

Este **CONSENTIMIENTO** establece un común acuerdo con la persona participante (paciente), con el tiempo previo que sea necesario para que esta última pueda ampliar su consulta y comprenderla, de manera que pueda tomar conscientemente la decisión de participar en la investigación.

CONSENTIMIENTO acordado a los ____ días del mes de _____ del año 20____.

Lic. Dayahindara Veitìa, Dra. María Correnti o

Dr. Juan Liuzzi

Firma del Participante

Firma Testigo 1

Firma Testigo 2

Cédula de Identidad

Cédula de Identidad

ANEXO 3: Encuesta realizada a los pacientes con CCECC así como controles sanos



PROYECTO LUZ PRO LAB -2007001088
FORMULARIO 1 (Hosp. Vargas)



Instituto
de Biomedicina

1 de 4

Referido desde:

Fecha: - -

Identificación
C.I.: -- Fecha de Nac.: - -

No. Identificación:

Lugar de Nacimiento País: Centro Poblado:

En Vnzla. Estado: Mun.:

Parroquia:

Lugar de Residencia Centro Poblado:

En Venezuela Estado: Mun.:

Parroquia:

Urbano ☐ Rural ☐ Coordenadas: LATITUD LONGITUD ALTITUD

Dirección
Av./Calle: Vereda: Sector:

Casa/Edif.: Piso: Apto. N°:

Tít. Habitación: Tít. Celular:

Email:

PERSONALES

1. Género Masc. ☐ Fem. ☐ 2. Edad:

3. RAZA

1. Caucásica (blanco)	☐
2. Negra	☐
3. Mestizo (trigueño)	☐
4. Asiática	☐
5. Árabe	☐
6. Indígena	☐



4. ¿Cuál es su estado civil?

1.- Casado	☐
2.- Viudo	☐
3.- Divorciado	☐
4.- Separado (casado pero no vive con su pareja legal)	☐
5.- Soltero (nunca se ha casado)	☐
6.- Unido	☐
99. No responde	☐

5. Cuántas personas componen su hogar 6. Cuántos menores hay,

7. Niños 8. Niñas Menores de 12

12 y más

9. ¿Quién es el jefe del hogar?

1. Yo. ☐ 2. Cónyuge ☐ 3. Padre ☐ 4. Madre ☐ 5. Padre y Madre ☐

6. Hijo(a) ☐ 7. Hermano ☐ 7. Otro ☐

ASPECTOS EDUCATIVOS Y LABORALES

14. ¿Último grado, año o semestre aprobado y de cuál nivel educativo?

0.- Ninguno	☐
1.- Básica (1-9) / Primaria (1-6)	☐
2.- Educación Especial	☐
3.- Media (1-2)	☐
4.- Técnico Medio (1-3)	☐
5.- Bachillerato (1-6)	☐
6.- Técnico Superior (Pre 6)	☐
7.- Universitario (Pre 6)	☐
8.- Misión Robinson I	☐
9.- Misión Robinson II	☐
10.- Misión Ribas	☐
11.- Misión Sucre	☐
99. No responde	☐

15. ¿Actividad?

1. Estudia	☐
2. Trabaja	☐
3. Estudia y trabaja	☐
4. Desempleado	☐
5. Jubilado/Pensionado	☐
6. Oficios del Hogar	☐
7. Discapacitado permanente	☐
99. No responde	☐



10. ¿Cuál es la profesión u oficio del jefe del hogar?

Universitario, empresario, ejecutivo, ☐

Técnico, comerciante, productor, perito, artista ☐

Empleado, pequeño comerciante o productor ☐

Obrero especializado, chofer, pintor, agricultor. ☐

Obrero no especializado, jornalero, serv. doméstico ☐

Otras:

11. ¿Nivel de Instrucción del jefe de hogar?

Egresado universitario, pedagógico, Instituto ☐

Secundaria completa ☐

Secundaria incompleta (2do. Año de Educ. Media) ☐

Alfabeto (algún grado de educación primaria) ☐

Analfabeto (no sabe leer ni escribir) ☐

12. ¿Cuál es la fuente de ingresos del jefe de hogar?

Rentas (fortuna heredada o adquirida) ☐

Ganancias (honorarios, utilidades) ☐

Sueldo (remuneración mensual a empleados) ☐

Salario (remuneración semanal por tarea o destajo) ☐

Donaciones (ayudas por organismos) ☐

13. ¿Condiciones de alojamiento de su hogar?

Óptimas condiciones con ambientes de lujo, espaciosos en urbanización elegante ☐

Óptimas condiciones sin lujo, ambientes espaciosos, en urbanización residencial ☐

Buenas condiciones sanitarias, zona residencial, comercial, industrial, espacios reducidos ☐

Deficiencia de algunas condiciones sanitarias, urbanización de interés social, barrios obreros ☐

Condiciones sanitarias inadecuadas, barrios marginales, viviendas rurales en malas condiciones ☐

16. ¿Trabaja usted actualmente?

SI ☐ No ☐

17. Su Profesión u Oficio

- 1 Universitario, empresario, ejecutivo,
 2 Técnico, comerciante, productor, peño, artista
 3 Empleado, pequeño comerciante o productor
 4 Obrero especializado, chofer, pintor, agricultor.
 5 Obrero no especializado, jornalero, serv. doméstico
 6 Trabajador(a) sexual
 7 Otra _____

☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES FAMILIARES

18. ¿Sabe si su mamá tuvo abortos? SI ☐ NO ☐19. ¿Cuántos? 20. ¿Cuántos hijos tuvo su mamá? 21. ¿Cuántos hermanos son menores que Ud.? 22. ¿Edad de su mamá cuando Ud. Nació? años23. ¿A quienes considera responsables de su ornanza? Padre ☐ Madre ☐ Ambos ☐Abuelo(a) ☐ Tio(a) ☐ Hermano(a) ☐ Otro ☐24. ¿Cuántas personas vivían en el hogar en el cual Ud. Se crió? 25. ¿Cuántos cuartos tenían para dormir? 

26. ¿Conoce de antecedentes familiares de Cáncer en su familia?

SI ☐ NO ☐

27. Si la respuesta es afirmativa, Indique en que lugares (selección múltiple)

1 Cuello del Utero	☐	8 Ovario	☐
2 mama	☐	9 Oseo	☐
3 Torax	☐	10 Cerebral	☐
4 Abdomen	☐	11 Próstata	☐
5 Hígado/Bazo	☐	12 Pene	☐
6 Cabeza-Cuello	☐	13 Anal	☐
7 Hemáticos	☐	14 No sabe	☐

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES PERSONALES

28. ¿Ha tenido Ud. mas de una pareja sexual a la vez en algún momento de su vida? SI ☐ NO ☐ No Responde ☐29. N° de parejas sexuales que ha tenido en el pasado 30. N° de parejas sexuales actualmente

31. ¿A padecido algún tipo de cancer? (selección múltiple)

SI ☐

1 Cuello del Utero	☐	8 Ovario	☐
2 mama	☐	9 Oseo	☐
3 Torax	☐	10 Cerebral	☐
4 Abdomen	☐	11 Próstata	☐
5 Hígado/Bazo	☐	12 Pene	☐
6 Cabeza-Cuello	☐	13 Anal	☐
7 Hemáticos	☐	14 No sabe	☐

NO ☐

32. Enfermedades que ha padecido a lo largo de su vida: (selección múltiple)

1 Hipertensión/ Cardiovasculares	☐
2 Diabetes	☐
3 Enf. Pulmonar crónica	☐
4 Artritis	☐
5 Lupus	☐
6 Esclerosis	☐
7 Alergias	☐
8 Otras	☐
9 Ninguna	☐

33. ¿Conoce Ud. las infecciones de transmisión sexual?

SI ☐ NO ☐ saltar a la 45

36. ¿Sabe como evitar las infecciones de transmisión sexual?

SI ☐ ¿Cómo? _____ NO ☐ saltar a la 40

39. ¿Por qué vía ha recibido información sobre ITS? (selección múltiple)

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. TV ☐ | 6. Familiares ☐ |
| 2. Prensa ☐ | 7. Revistas ☐ |
| 3. Radio ☐ | 8. En clase ☐ |
| 4. Amigos ☐ | 9. Profesores ☐ |
| 5. Padres ☐ | 10. Internet ☐ |

34. ¿Cuáles infecciones de transmisión sexual conoce Ud.?

- | |
|---|
| 1 |
| 2 |
| 3 |
| 4 |
| 5 |
| 6 |

37. ¿Sabe adónde acudir si sospecha que tiene una infección de transmisión sexual?

SI ☐ NO ☐ saltar a la 40

11. Otra ¿Cuál? _____

35. ¿Padece o ha padecido alguna de las siguientes ITS? (selección múltiple)

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1. Sífilis ☐ | 5. Chancro ☐ |
| 2. Gonorrea ☐ | 6. Herpes simple ☐ |
| 3. VPH ☐ | 7. Chlamydia ☐ |
| 4. HIV/SIDA ☐ | 8. Vaginitis ☐ |
| | 9. Ninguna ☐ |

38. ¿A quién acudiría?

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. Padres ☐ | 3. Médicos ☐ |
| 2. Amigos ☐ | 4. Familiares ☐ |
| | 4. Otro ¿Quién? _____ |

40. ¿Ha recibido información sobre salud sexual y reproductiva?

SI ☐ NO ☐**Solo para Mujeres**41. ¿A qué edad tuvo su 1ra. menstruación? años (menarquia)47. ¿A qué edad tuvo su primer hijo? años42. ¿Ha estado embarazada? SI ☐ NO ☐ Saltar a la 5843. ¿Cuántos embarazos ha tenido? 44. ¿Cuántos partos ha tenido? 45. ¿Cuántos hijos ha tenido? 46. ¿A qué edad quedó embarazada por primera vez? años48. ¿Cuántos abortos ha tenido?

49. Tipo

- | |
|--|
| 1. Espontáneo ☐ |
| 2. Provocado ☐ |
| 3. Por medicamentos ☐ |
| 4. Por accidente ☐ |
| 5. Otro motivo ☐ |

Solo para Hombres

50. ¿Ha provocado Ud. Embarazos?

SI ☐ ¿Cuántos?
NO ☐ saltar a la 58
NO sabe ☐

55. ¿Tiene hijos?

SI ☐
NO ☐ saltar a la 58
NO sabe ☐

52. ¿Alguno de esos embarazos ha terminado en aborto?

SI ☐ ¿Cuántos?
NO ☐ saltar a la 58
NO sabe ☐

57. ¿Qué edad tenía Ud. Cuando nació su primer hijo?

 años

54. ¿Estuvo de acuerdo con que se practicaran esos abortos?

SI ☐ En algunos casos ☐
NO ☐ No le consultaron ☐58. ¿Se ha hecho Ud. una citología anteriormente? SI ☐ NO ☐59. ¿Conoce las siglas VPH? SI ☐ NO ☐60. ¿Tiene Ud. un diagnóstico previo de VPH? SI ☐ NO ☐61. ¿Ha recibido Ud. Información de cáncer de Cuello uterino? SI ☐ NO ☐62. ¿Conoce Ud. la relación entre VPH y cáncer de Cuello uterino? SI ☐ NO ☐63. ¿Tiene Información sobre la vacuna de VPH? SI ☐ NO ☐64. ¿Se vacunaría Ud.? SI ☐ NO ☐65. ¿Vacunaría a una hija suya de 9 años? SI ☐ NO ☐66. ¿Le ha hablado a sus hijos sobre su sexualidad? SI ☐ NO ☐

67. ¿Conoce Ud. Métodos anticonceptivos?

SI ☐ NO ☐ Saltar a la 70

70. ¿Conoce Ud. Métodos de prevención de ITS?

SI ☐ NO ☐ Saltar a la 75

68. ¿Cuáles métodos anticonceptivos conoce?

71. ¿Cuáles métodos de prevención de ITS conoce?

69. ¿Utiliza Ud. Métodos anticonceptivos, cuales?

(selección múltiple)

Método	Actual	Utilizó
1 Dispositivo intrauterino	☐	☐
2 Diafragma	☐	☐
3 Espermicidas	☐	☐
4 Método del ritmo	☐	☐
5 Coito interrumpido	☐	☐
6 Inyección hormonal	☐	☐
7 Píldora anticonceptiva	☐	☐
8 Abstinencia	☐	☐
9 Otro	☐	☐
10 Ninguno	☐	☐

72. ¿Utiliza Ud. Métodos de prevención de ITS, cuales?

(selección múltiple)

Método	Actual	Utilizó
1 Condón masculino	☐	☐
2 Condón femenino	☐	☐
3 Diafragma	☐	☐
4 Geles Microbicidas	☐	☐
5 Barrera oral	☐	☐
6 Abstinencia	☐	☐
8 Otro	☐	☐
9 Ninguno	☐	☐

73. ¿Le ha hablado a sus hijos sobre métodos de prevención del embarazo? SI ☐ NO ☐74. ¿Le ha hablado a sus hijos sobre métodos de prevención de ITS? SI ☐ NO ☐

HABITOS

75. ¿Ud. Fuma o ha fumado cigarrillos?	SI ☐	NO ☐
76. N° de cigarrillos diarios que fuma o fumaba		
77. ¿Por cuantos años ha fumado?		
78. ¿Consume o ha consumido alcohol?	SI ☐	NO ☐
79. ¿Cuántos días a la semana consume o consumió?		
80. ¿Por cuantos años ha consumido?		
81. ¿Ud. Consume o ha consumido café?	SI ☐	NO ☐
82. ¿Cuántas tazas consume al día?		
83. ¿Por cuantos años ha consumido?		

84. ¿Ud. Consume o ha consumido drogas?

SI ☐ NO ☐No Responde ☐

85. Si la respuesta es afirmativa

86. ¿Por Cuantos años?

Forma de consumo

1	Fumada
2	Inhalada
3	Injectada
4	Tomada
5	Otra forma

87. ¿Cuáles son las razones o causas por las cuales Ud. asiste a este centro de salud?

1	Prevención	
2	Control médico	
3	Sospecha de algún trastorno	
4	Recomendación médica	
5	Tratamiento	
6	Sugerencia de familiar o amigo	
7	Otra razón ¿Cuál?	



Observaciones:

Encuestador:

Referencias Bibliográficas

1. **Abbas Abdul, Lichtman Andrew, Pillai Shiv.** Inmunología Celular y Molecular. 6ta Edición. Editorial Elseiver Saunders. Barcelona-España. 2008.
2. **Acha A, Ruesga M, Rodríguez M, Martínez M, Aguirre M.** Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. Oral Medicine and Pathology. 2005;10:95-102.
3. **Alroy I; Yarden Y.** The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. Federation European Biochemical Societies Letters. 1997; 410 (1): 83-86.
4. **Altuna X, Algaba ,ang J, Weiseman R, Ongkeko.** Estudio por inmunohistoquímica de la expresión del EGFR en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Acta de Otorrinolaringología Española. 2005;55:143-146.
5. **Alvarez Vicent J, Sacristán T.** Cáncer de cuerda vocal. Ponencia Oficial de la XXXII Reunión Anual de la SEORL y Patología Cervico-Facial. Barcelona: Farma Cusí. 1995;45-50.
6. **Ambinder R.** Epstein- Barr virus associated lymphoproliferative disorders. Review Clinical Experimental Hematology. 2003; 74: 362-374.
7. **Ang K, Berkey B, Tu X, Zhang H, Katz R, Hammond E, Fu K, et al.** Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. Cancer Research. 2002;62(24):7350-6.
8. **Anuario de mortalidad del Ministerio de Poder Popular para la Salud de la República Bolivariana de Venezuela.** Año 2013. Disponible online <http://www.mpps.gob.ve>. Consultado en 2017.
9. **Arias F, Villafranca E, Dueñas MT, Vera R.** Factores de pronóstico en carcinoma de cabeza y cuello. Servicio de oncología, Hospital de Navarra. Pamplona. 2007.
10. **Arreaza A, Correnti M, Ávila M.** Detección de virus Epsetein-Barr en lesiones de liquen plano bucal. Acta Odontológica Venezolana. 2010;48(3):1-9

11. **Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML.** Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Research.* 2000;20:1301–1306.
12. **Badulescu F, Crisan A., Badulescu A, Schenker M.** Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* 2010; 51(3):437–440.
13. **Badulescu F, Crisan A., Badulescu A, Schenker M.** Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* 2010; 51(3):437–440
14. **Barbatis C, Loukas L, Grigoriou M, Nikolaou I, Tsikou A, Marsan N, Gatter KC, Kaklamanis L.** p53 Overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology.* 1995;48:M194-M197.
15. **Barket J, Batkova J, Vojtesek B, et al.** Patterns of expression of the p53 tumours suppressor in human breast cancer tissue and tumours in situ and in vitro. *International Journal of Cancer.* 1990;46:839-844.
16. **Baselga J, Swain SM.** Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Review Cancer.* 2009;9(7):463-75.
17. **Battista G, Comba P, Orsi D, Norpoth K, Maier A.** Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *Journal of Cancer Research/ Clinical Oncology.* 1995; 121: 1-6
18. **Bellas C, A. Santón, G. Plaza.** Virus Epstein-Barr y Neoplasia. *Revista del Hospital Ramón y Cajal.* 2004
19. **Beltramino M, Calmet R, Gatica M.** Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. *Hematología.* 2005; 9(2):39-54.
20. **Betiol J, Villa L, Sichero L.** Impact of HPV infection on the development of head and Neck cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2013;46:217-226.
21. **Bina J., Ravi H., Gunnvor O., Ali K., Endre V., Salah I.** Expression of p53, cyclin D1, and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions: Association with clinicopathological parameters. 2005;25:4699-4706

22. **Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni Jr JF.** Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research*. 1998; 48: 3282-3287.
23. **Blume-Jensen P, Hunter T.** Oncogenic Kinase signaling. *Nature*. 2001;28:67-79.
24. **Boffetta P.** Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6392– 6403.
25. **Boffetto P, Hashibe M.** Alcohol and cancer. *Lancet Oncology*. 2006;7:149-156.
26. **Boonstra J; Rijken P; Humbel B; Cremers F; Verkleij A; Van Bergen en Henegouwen P.** The epidermal growth factor. *Cell Biology International*. 1995;19(5):413-30.
27. **Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T.** "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells". *Journal Cell. Physiology*. 2006; 206(3):624–35.
28. **Burd, E.** Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Review*. 2003; 16(1):1-17
29. **Burns, J., Maitland, N.** Human papillomaviruses and cancer. *Microbiology Tod*. 2005;56: 116-120.
30. **Cadena DL; Gill GN.** Receptor tyrosine kinases. *Federation American Societies of Experimental Biology Journal*. 1992;6(6):2332-7.
31. **Caelles C, Helmberg A, Karin M.** p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 1994;370:220-223.
32. **Carpenter G.** Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual Review of Biochemistry*, 1987; 56: 881-914.
33. **Carpenter G; Cohen S.** Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 1979; 48: 193-216.
34. **Carrera-Cáceres S, Hernández-Hernández D, Apresa T, Gallegos F, Guido M and García A.** Prevalence of human Papillomavirus in head and neck cancer in Mexico: a case-control study. 24th Annual Meeting of the National Cancer Institute of Mexico. February 2007.

35. **Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Anwar M, Bukhari MH, Carrascal E, y col.** Human Papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries. *Journal of Clinical Virology*. 2011;17:5295-5304
36. **Chai RC, Lambie D, Verma M, Punyadeera C.** Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Medical*. 2015;4(4):596-607.
37. **Chandrani P, Kulkarni V, Iyer P, Upadhyay P, Chaubal R, Das P, et al.** Dutt A. NGS-based approach to determine the presence of HPV and their sites of integration in human cancer genome. *British Journal of Cancer*. 2015;112:1958–1965.
38. **Chen R, Leena-Maija E, Vaheti A.** Human Papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Reviews in medical virology*. 2005.
39. **Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP.** Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265:3.446-3.455.
40. **Cobb MH.** MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999;71(3-4): 479-500.
41. **Cohen JI.** Infección por el Virus de Epstein-Barr (VEB). *The New England Journal of Medicine*. 2000.15:183-191.
42. **Cordes C, Münzel AK, Rudolph P, Hoffmann M, Leuschner I, Gottschlich S.** Immunohistochemical staining of Ki-67 using the monoclonal antibody Ki-s11 is a prognostic indicator for laryngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*. 2009;29(4):1459-65.
43. **Correnti M, Rivera H, Cavazza ME.** Detection of Human Papillomavirus of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Oncology/Microbiology. Oral Diseases*. 2004;10:163-166.
44. **Cortés, E., Leal, C.** Papilomavirus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis. Revista de Salud Pública Nutr*. 2001; 2: 10-15
45. **Couture C, Raybaud-Diogenè H, Têtu B, Bairati I, Murry D, Allard J, Fortin A.** p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*. 2002.1;94(3):713-22.

46. **Crawford R, Caldwell C, Lies R, Lowe D, Shepherd J, Chard T.** Prognostic significance of the bcl2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British Journal of Cancer*.1998; 78(2): 210-214.
47. **Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.** Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of trombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1.582-1.584.
48. **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116 (2):205-19
49. **Daniel JH, Edwardine N, David B, Rosemari M, Anthony M, Deborah G, Everett V, Ralph W.** Human Papilloma Virus and p53 in Head and Neck Cancer: Clinical Correlates and Survival. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2:755-762.
50. **Davis RJ.** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268 (20): 14553-6.
51. **De Petrini M, Rittá M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C,et al.** Head and neck squamous cell carcinoma: Role of the human papillomavirus in toumour progression. *The New Microbiological*. 2006;29:25-33.
52. **Del Río L, Soto S, Camargo M, Moreno D, Sánchez R, Pérez A, et al.**The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer*: 2015; 15:100-111.
53. **Deng Z, Uehara T, Maeda H, Hasegawa M,Matayoshi S, Kiyuna A, et al.** Epstein - Barr virus and Human Papillomavirus infection and genotype distribution in Head and Neck Cancers. *POLS ONE*. 2014;9(11):e113702.
54. **Di Fiore PP; Pierce JH; Fleming TP; Hazan R; Ullrich A; King CR; Schlessinger J; Aaronson SA.**Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, 1987; 51 (6): 1063-70.
55. **Diestro, M., Serrano M., Gómez F.** Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al Virus del Papiloma Humano (VPH). *Oncologia*. 2007; 30 (2):42-59.
56. **Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, Gasparotto D, Barzan L, Pastore A, Romanelli M, Boiocchi M.** p53 overexpression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *International Journal of Cancer* 1992;52:178-1 82.

57. **Doorbar J.** The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005, 32S:S7-S15.
58. **Druesne-Pecollo, N, Tehard, B, Mallet, Y, et al.** Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet of Oncology* 2009; 10:173
59. **Elzagheid A, Kuopio T, Pyrhönen S, Collan Y.** Lymph node status as a guide to selection of available prognostic markers in breast cancer: the clinical practice of the future?. *Diagnostic Pathology*. 2006; 1: 41-53.
60. **Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W.** "Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair". *Molecular and Cell Biology*. 2005; 25 (21): 9350–9359
61. **Esteban F, Ruiz F, Concha A, Pérez N, Ruiz F, Garrido F.** Relationship of 4F2 Antigen with Local Growth and Metastatic Potential of Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *British Journal of Cancer*. 1990; 62: 1047-1051.
62. **Farrell, P.J.** Signal transduction from the Epstein-Barr virus LMP1 transforming protein. *Trends of Microbiology*. 1998; 6: 175-177.
63. **Fonseca E.** Factores de riesgo e historia natural del cáncer de cabeza y cuello. En: Cruz Hernandez JJ. *Cancer de Cabeza y cuello (Monografías de Oncología médica 2005)*. You & Us Ediciones. 2005: 3-14.
64. **Fouret, P, Monceaux, G, Teman, S, Lacourreye, L, Guily, J.** Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 1997; 123: 513-516
65. **Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S, Takahashi A, Tamiya T, Ogata T.** Prognostic significance of human papillomavirus genomes (type-16, -18) and aberrant expression of p53 protein in human oesophageal cancer. *International Journal of Cancer*. 1993; 54: 226-230.
66. **Gahn T and Scildkraut C.** The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, ori P, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*. 1989; 58: 527-535.

67. **Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S.** Bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clinical of Cancer Research*. 1996;2(2):261-267.
68. **Gelardi M, Tomaiuolo M, Cassano M, Besozzi G, Fiorella ML, Calvario A, Castellano M, Cassano P.** Epstein-Barr virus induced cellular changes in nasal mucosa. *Journal of Virology*. 2006; 3:6-9
69. **Gillison ML.** Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implication for clinical research in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24:5623-5625.
70. **Gillison M, Koch W, Capone R, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al.** Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of Natural Cancer Institute*. 2000;92(9):709-20.
71. **Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R, Sapp M.** Human Papillomavirus infection requires cell surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*. 2001; 75 (3): 1565-1570.
72. **GLOBOCAN 2008 v2.0,** Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Accessed on 2016. Available from: URL: [http: //globocan.iarc.fr/](http://globocan.iarc.fr/)
73. **Golusinski W, Szmeja Z, Olofsson W, Kryngier A, Majewski P.** Retrospective analysis of selected tumour markers (p59, PCNA, Ki-67, DNA ploidy) and ultrastructurated in patientes with larynx carcinomas. *Head and Neck Oncology*. 1998;46:233-240.
74. **González-Moles M.A., Rodríguez-Archilla A.** Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head and Neck*. 2000; 22: 658-61.
75. **Goñi Ignacio.** Cáncer Escamoso de Cabeza y Cuello. *Manual de Patología Quirúrgica de Cabeza y Cuello*. Pontificia Universidad de Chile. 2006.
76. **Goulart F, Guevara J, Brigolini J, Morales R, Carene G, Pereira F.** Efectos bucales de la nuez de betel. *Kiru*. 2012; 9(2):1167-170.

77. **Graham SV.** Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future of Microbiology*. 2010; 5(10): 1493–1506.
78. **Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE.** Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal. of Natural Cancer Institute*. 1998; 90:824.832.
79. **Grandis JR, Tewardy DJ.** Elevated levels of TGF- α and EGFR messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research*. 1993;53:3579-3584.
80. **Groves I, Coleman N.** Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *Journal of Pathology*.2015; 235:527–538.
81. **Guily J, ClavelCh, Okais C, Pretet J, Baby-Defaux A, Agius G, y col.** Human Papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head and Neck Oncology*. 2011; 3-6
82. **Hagedorn H, Tübel J, Wiest I, Nerlich A.**In situ apoptotic and proliferation index in laryngeal squamous cell carcinomas.*Anal Cell of Pathology*.1998;16(3):177-84.
83. **Haigentz M.** Aerodigestive cancers in HIV infection. *Current Opinion in Oncology*. 2005;17:474–478.
84. **Haley JD; Hsuan JJ; Waterfield MD.**Analysis of mammalian fibroblast transformation by normal and mutated human EGF receptors. *Oncogene*, 1989;4 (3): 273-83
85. **Haraf D, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al.** Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival.*Clinical Cancer Research*.1996;2(4):755-62.
86. **Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ.** The p21 Cdk-interacting protein is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.
87. **Hartmann LC, Sebo TJ, Kamel NA.** Proliferating cell nuclear antigen in epithelial ovarian cancer. *Gynecology and Oncology*. 1992;47:191-195
88. **Heldi CH.** SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*. 1991;16 (12): 450-2

89. **Herbst, R. S., Fukuoka, M. & Baselga, J.** Gefitinib- a novel targeted approach to treating cancer. *Nature Review of Cancer*. 2004;4: 956–965
90. **Herity B, Moriarty M, Burke BJ.** A case control study of head and neck cancer in the Republic of Ireland . *British Journal of Cancer* 1981; 43: 177.
91. **Hinds, M.G.** Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(1):128-136
92. **Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasala H, Martin S.** p53 expression and cell proliferation as prognostic factor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal Clinical Oncology*. 1997;15:3111-3120.
93. **Hockenbery D, Oltvai Z, Yin X, Millman C, Korsmeyer S.** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*.1993;75:241-251.
94. **Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S.** "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO". *Nature*.1992;419 (6903): 135–141.
95. **Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al.** Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature Genetic*.2015; 47:158–163.
96. **Isobe R, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM.** Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p3. *Nature*. 1986;320:84-5.
97. **Jain S, Filipe MI, Hall PA, Lane DP, Levison DA.** Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 1991;44:655-659.
98. **Jemal A, Murray T, Ward E et al.** Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer Journal of Clinical* 2005; 55: 10-30.
99. **Jemal A, Siegel R, Ward E. et al.** Cancer statistic 2009. *CA Cancer Journal of clinical*.2009;59:225
100. **Jiang R, Ekshyyan O, Moore T, Rong X, Nathan S, Gu X, et al.** Association between HPV/EBV co-infection and oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2015;44(1):28–36.

101. **Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza M, Perrone M.** Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2001;30(7):385-388.
102. **Jimenez C.** Detección y tipificación de VPH en un grupo de pacientes venezolanos con entidades clínicas benignas. Tesis de grado para optar al título de magister en medicina estomatológica. UCV. 1998.
103. **Jimenez Y, Coca R.** Factores pronóstico en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. *Acta Medica del Centro*. 2013;7(4).
104. **Jiwa NM, Oudejans JJ, Bai MC.** Expression of bcl-2 protein and transcription of the Epstein-Barr virus bcl-2 homologue BHRF-1 in Hodgkin's disease: Implications of different pathogenic mechanism. *Histopathology* 1995, 26: 547-553.
105. **Kaye KM, Izumi KM, Kieff E.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 90: 9150-154.
106. **Kessis T, Slebos R, Nelson W, Kastan M, Plunkett B, Han S, et al.** Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9):3988-92.
107. **Klemi PJ, Alanen K, Jalkanen S, Joensuu H.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Cancer*. 1992;66:739-743.
108. **Kohzoh I & Akinori T.** Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 20016;6:714-727.
109. **Koskinen W, Chen R, Leivo I, Mäkitie A, Bäck L, Kontio R, y col.** Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *International Journal of Cancer*. 2003;107:401-406.
110. **Kouvidou C, Kanavaros P, Papaioannou D, Stathopoulos E, Sotsiou F, Datseris G, et al.** Expression of bcl-2 and p53 proteins in nasopharyngeal carcinoma. Absence of correlation with the presence of EBV encoded EBEB1-2 transcripts and latent membrane protein- 1. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*. 1995;48:M17-M22.

111. **Kreimer A, Clifford G, Boyle P, Francsechi S.** Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology Biomarkeres Preview*. 2005;14:467-475.
112. **Kupisz K, Stepulak A, Zdunek M, Klatka J.** Preliminary results of prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in advanced primary larynx carcinomas and lymph node metastases. *Arch Med Sci*. 2010;6(1):65-70.
113. **Kurman, R.** (2002). *Blustein's pathology of the female genital tract*. Springer. Quinta Edición. Nueva York, E.U.A.
114. **Lane D, Crawford L.** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-263.
115. **Lane DP.** Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-26.
116. **Laudansku J, Niklinska W, Burzycousky T, Chyczewsky L, Nicklinsky J.** Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*. 2001;17:660-666.
117. **Lehmann AR, Fuchs RP.** "Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models". *DNA Repair (Amst.)* 2006;5 (12): 1495–1498.
118. **Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, et al.** "PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables". *Journal of Clinical Patholgy*. 1992;45 (5): 416–419.
119. **Letian, T., Zhang, T.** Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Journal of Virology*. 2010; 7 (2): 1-7
120. **Lewin, F, Norell, SE, Johansson, H, et al.** Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998; 82:1367.
121. **Leyraz S, Henle B, Chahinian A.** Association of Epstein- Barr virus with tymic carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1985; 312:1296.
122. **Li G, Ho V.** P53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high and low-dose ultraviolet radiation. *British. Journal. Ermatology*. 1998;139.

123. **Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature (Lond)* 1994; 371: 534-537
124. **Li W, Thompson C, O'Brien C, McNeil E, Scolyer R, Cossart Yet al.** Human Papillomavirus positive predicts favorable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *ELSEVIER* 2003;1606:553-558
125. **Lieber C, Garro A, Leo M, Mak K, Worner T.** Alcohol and cancer. *Hepatology*1986;6:1005-19.
126. **Lillsunde G, Helenius G, Sorbe B, Karlsson M.** Viral Load, Integration and Methylation of E2BS3 and 4 in Human Papilloma Virus (HPV) 16-Positive Vaginal and Vulvar Carcinomas. *PLOS ONE*. 2014;9(11):e112839.
127. **Liloglou T, Scholes A, Spandidos D, Vaughan D, Jones A, Field J.** p53 Mutatins in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck Predominate in a Subgroup of Former and Present Smokers With a Low Frequency of Genetic Instability. *Cancer Research* 1997; 57:4070-4074.
128. **Lin C-T, Lin C-R, Tan G-K, Chen W, Dee AN, Chan W-Y.** The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *American Journal of Pathology*1997; 150: 1745-1756.
129. **Ling P., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., y col.** Life cycle heterogeneity in animal models of Human Papillomavirus-Associated disease. *Journal of Virology*. 2002;76 (20):10401-10416
130. **Liuzzi J, Estanga N, Castillo L, Correnti M, Mijares A, Gardie J.** Tipificación del Virus de Papiloma humano en carcinoma de células escamosas de Cabeza y cuello. *Revista de la Sociedad Venezolana de Oncología*. 2007; 19(3):210-218.
131. **Liviu F, Wood N, Razia K, Lemmer J.** Human Papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human Papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & Neck Medicinine*. 2010; 6(14). Disponible on-line: <http://www.head-face-med.com/content/6/1/14> (consultado en octubre 2011).

132. **Llamaron A.** Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathology and Medicine*. 2004;33:30-36.
133. **Lowenstein EJ; Daly RJ; Batzer AG; Li W; Margolis B; Lammers R; et al.** The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992; 70 (3): 431-42
134. **Lowry S.** Alcoholism in cancer of the head and neck. *Laryngoscope* 1975;85:1275-8.
135. **Lydiatt, W, Patel S, O’Sullivan B, Brandwein M, Ridge J, Migliacci J.** Head and Neck Cancers—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer Journal Clinical*. 2017;67:122–137.
136. **Leyraz S, Henle B, Chahinian A.** Association of Epstein- Barr virus with tymphic carcinoma. *New England Journal Medical*. 1985; 312:1296.
137. **Mack D, Vartikar J, Pipas J, Laimins L.** Specific repression of TATA mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature (Lond)* 1993; 363: 281-283.
138. **Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Doglioni C, Pelucchi S, Barzan L, et al.** High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 1992;7:1159-66.
139. **Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, et al.** Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiology and Oncology*. 2014; 48(1): 1–10.
140. **Mandell G., Bennett J., Dolin R.** *Enfermedades infecciosas*. Elsevier España C.A. Sexta edición. Madrid, España. 2006;4 (3): 273-83.
141. **Martin S, Young S.** P53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis*. 2002;7(2): 149-156.
142. .
143. **Martinez I, Wang J, Hobson K, Ferris R, Khan S.** Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *European Journal of Cancer*. 2007; 43(2): 415–432.

144. **Martínez Vidal A.** Patología del cáncer de laringe. Otorrinolaringología. Barcelona: Doyma, 1992;561-5
145. **Massagué J.** Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. Journal of Biological Chemistry. 1990;265 (35): 21393-6.
146. **Massagué J; Pandiella A.** Membrane-anchored growth factors. Annual Review of Biochemistry. 1993, 62: 515-41
147. **Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK.** "Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin". Embryology Journal. 1987;6 (3): 637-42.
148. **Mattox E, Von Hoff D, McGuire L.** Androgen receptors and antiandrogen therapy for laryngeal carcinoma. Arch Otolaryngology 1984;110:721-4.
149. **Mc Cance D.** Human papillomaviruses and cancer. Biochemical Biophysics Act 1985;823:195-20
150. **Mellin H, Dahlgren L, Muner E, Lindholm J, Ribbani H, Kalantari M, et al.** Human Papillomavirus type 16 is an episomal and high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. International Journal of Cancer. 2002;1002:152-158.
151. **Mendoza J y Rojas A.** Diagnóstico serológico de la infección por Virus de Epstein-Barr. Control Calidad SEIMC. Disponible on-line: <http://www.seimc.org/control/revisiones/serologia/ebvrev.pdf>. Consultada en febrero de 2011.
152. **Merlino G, Xu Y, Ishii S, Clark A, Semba K, Toyoshima K, et al.** Oncogenes y genes supresores: Mecanismos de la Apoptosis. Conferencia Clínica 1995.
153. **Mezquita C.** Oncogenes y genes supresores: Mecanismos de la apoptosis. Medicina clínica. 1995;105:389-395.
154. **Michaud W, Nichols A, Mroz E, Faquin W, Clark J, Begum S, et al.** Bcl-2 Blocks Cisplatin-Induced Apoptosis and Predicts Poor Outcome Following Chemoradiation Treatment in Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Clinical of Cancer Research. 2009. 15:1645-1654.

155. **Middeldorp J, Brink A, van den Brule A, Meijer C.** Pathogenic roles for EBV gene products in EBV- associated proliferative disorders. Critical reviews in Oncology and Hematology.2003; 45 (1): 1-36.
156. **MiddeltonT and Sdgen B.** Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA 1. Journal of Virology.1994; 68: 4067-4071.
157. **Miller CS.** Pleiotrophic mechanisms of virus survival and persistence. Oral Surgery/ Oral Medicine/ Oral Pathology/ Oral Radiology Endodoncy.2005, 100:527-536
158. **Molina J, Ping Y, Cassivi S, Schild S, Adjei A.** Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. National institute of health.2008;83(5):584-594.
159. **Momand J, Zambetti G, Olson D, George D, Levine A.** The mdm-2 oncogen product forms a complex with the p53 proteiprotein and inhibits p53 mediated transactivation. Cell 1992; 69: 1.237-1.245.
160. **Mooren J, Gultekin S, Straetmans J, Haesevoets A, Peutz-Kootstra C, Huebbers C, et al.** P16 (INK4A) immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. International Journal of Cancer.2014; 134:2108–2117.
161. **Mork J, Lie A, Glatte E, Hallmans G, Jellum , Koskela, et al.** Humn papillomavirus types in head and neck squamous-cell carcinoma of the head and neck. New England Journal of Medicine. 2001;334:1125-1131.
162. **Mortalidad On-line Centro Nacional de Epidemiologia.** <http://193.146.50.130/>
163. **Munck-Wikland E, Fernberg JO, Kuylenstierna R.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and nuclear DNA content in predicting recurrence after radiotherapy of early glottic cancer. European Journal Cancer. 1993; 29B: 75–79.
164. **Nghiem P, Kupper TS.** Basal and squamous cell carcinomas. In Principles of molecular medicine 1st edition. Edited by: Jameson JL. Totowa New Jersey: Humana Press Inc; 1998:65-72.

165. **Ogden GR, Chisholm DM, Kiddie RA, Lane DP.** P53 protein in odontogenic cysts: increased expression in some odontogenic keratocysts. *journal of clinical pathology*. 1992;45:1007-1010.
166. **Ohshima K, Kikuchi M, Masuda Y, Sumiyoshi Y, Eguchi F, Mohtai H, et al.** Epstein-Barr viral genomes in carcinoma metastatic to lymph nodes. Association with nasopharyngeal carcinoma. *Act Pathology Japanese*. 1991;41(6):437-43.
167. **Ojesina A, Lichtenstein L, Freeman S, Pdamallu C, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al.** Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2014; 506:371–375.
168. **Olthof N, Straetmans J, Snoeck R, Ramaekers F, Kremer B, Speel E.** Next generation treatment strategies for HPV-related head and neck squamous cell carcinomas: where do we go?. *Review Medical of Virology*. 2012; 22:88–105.
169. **Özel E, Özbilim G, Gamze M, Güney K.** P53 and Ki-67 Expression in nasopharyngeal carcinomas. *Turkish journal of cancer*. 2004; 34(3): 106-109.
170. **Paredes J.** Cáncer de laringe. Factores etiológicos y oncogenes. *Oral Diseases*. 2004;31(1):14-32.
171. **Parfenov M, Pdamallu C, Gehlenborg N, Freeman S, Danilova L, Bristow C, et al.** Cancer Genome Atlas Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:15544–15549
172. **Parker T, Smith E, Ritchie J, Haugen T, Vonka V, Turek L, et al.** Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncology*. 2006; 42: 288-296
173. **Pazzela F, Tse A, Cordell J, Plford K, Gatter K, Mason D.** Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14:18 chromosomal traslocation. *American Journal of Pathology*. 1990;137:225-232.
174. **Pelley R; Maihle N; Boerkoel C; Shu H; Carter T; Moscovici C; et al.** Disease tropism of c-erbB: effects of carboxyl-terminal tyrosine and internal mutations on tissue-specific transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86 (18): 7164-8.

175. **Pérez A, Lozano A, García T, Labella T, Clemente A.** Proteína P53 mediante Inmunohistoquímica en el carcinoma epidermoide de laringe. *Acta de Otorrinolaringología*. 2003;54:263-268
176. **Petros, A, Olejniczak E, Fesik S.** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochemistry and Biophysics Act*, 2004. 1644(2-3): p. 83-94).
177. **Pich A, Chiusa L, Pisani P.** Argyrophilic nucleolar organizer region counts and proliferating cell nuclear antigen scores are two reliable indicators of survival in pharyngeal carcinoma. *Journal Cancer Research*. 1992; 119: 106–110.
178. **Pinch A, Chiusa L, Navone R.** Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumour. *Annals of Oncology*. 2004;15:1319-1329.
179. **Pollán M, López-Abente G.** Wood-related occupations and laryngeal cancer. *Cancer Detect Prev*. 1995;19(3):250-7.
180. **Ponce J, Lares H, Mattar D, Correnti M, Ávila M.** Determinación genómica de Virus Epstein-Barr en tumores del tracto aerodigestivo superior. *Revista Venezolana de Oncología*. 2008;20(1):11-15.
181. **Preciado M, De Matteo E, Diez B, Grinstein S.** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein (LMP) in tumor cells of Hodgkin's disease in pediatric patients. *Medical Pediatrics of Oncology*. 1995;24(1):1-5.
182. **Prokimmer M, Rotter V.** Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projections in on the hematologic cells lineages. *Blod*. 1994;84:2391-2411.
183. **Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Ronchetti D, Cesana B, Ottaviani A.** Clinical relevance of p53 and Bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 1998;79:263-268.
184. **Pulkkinen J, Penttinen M, Jalkanen M, Klemi P, Grénman R.** Syndecan-1: a new prognostic marker in laryngeal cancer. *Act of Otolaryngology*. 1997;117(2):312-5.
185. **Quon H, Liu FF, Cummings BJ.** Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and neck*. 2001;2:147-159.
186. **Ralf Kùppers.** B Cells under influence: Transformation of B Cells by Epstein-Barr Virus. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3: 801-810.

187. **Rebecca C. Taylor, Sean P. Cullen and Seamus J. Martin.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level NPG 2008 March Volumen 9
188. **Ringstrom E, Peters E, Hasegawa.** Human Papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical Cancer. Research. 2002;8:3187-3192.
189. **Rivera, R., Delgado, J., Painel, V., Barrero, R., Larraín, A.** Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 2006;71 (2):135-140
190. **Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt E, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G.** Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. Act of Otolaryngology. 2005; 125: 1327-1336.
191. **Rowe D.** Epstein-Barr virus immortalization and latency. Front Biosci 1999; 4: 346-371.
192. **Rozakis-Adcock M; Fernley R; Wade J; Pawson T; Bowtell D.** The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. Nature, 1993,363 (6424): 83-5
193. **Rusan M, Li YY, Hammerman PS** .Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers. Clininical of Cancer Research.2015; 21:2009–2019.
194. **Salazar C, Smith R, Garg M, Haigentz M, Schiff B, Kawachi N, et al.** Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival: A Comparison by Tumor Site and Initial Treatment. Head and Neck Pathology.2014;8:77–87.
195. **Sarac S, Ayhan A, Hosal AS, Kaya S.** Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer. Arch Otolaryngology, Head Neck Surgery 1998; 124: 1321–1324.
196. **Scheffner M, Werness B, Huibregtse J. Levine A, Howley P.** The E6 oncoprotein encoded by papillomavirus types 16 and 18 promotes degradation of p53. Cell 1990; 63: 1.129-1.136

197. **Schlessinger J.** Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. Trends in Biochemical Sciences, 1988 Nov,13(11):443-7.
198. **Scholzen T, J Gerdes .**"La proteína Ki-67: de lo conocido y lo desconocido" JuornalCelularPhysiology .2000; 182 (3): 311-22.
199. **Seaman W, Andrews E, Couch M, Kojic E, Cu-Uvin S, Palefsky J, et al.** Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. Virology Journal 2010; 7:194-211.
200. **Sharon S, Sherritt M, Silleri J, Cross S, Elliott S, Bharadwaj M, et al.**Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. Blood.2001; 98(13): 3739-3744.
201. **Shivji KK, Kenny MK, Wood RD.** "Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair". Cell. 1992;69 (2): 367–74.
202. **Si H, Wah S, Ping C, Wong Y, Man A.** Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. Journal of Clinical Virology. 2005;32: 19–23.
203. **Silins S, Sherritt M, Silleri J, Cross S, Elliott S, Bharadwaj M, et al.** Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. Blood. 2001; 98(13): 3739-3744.
204. **Sloan D, Goepfert H.** Conventional Therapy of the head and neck. In Hematology Oncology Clinical of North America. 1991; 5: 601-625
205. **Smith M, Seo Y.** p53 Regulation af DNA excision repair pathways. Mutagenesis. 17;2:149-156.
206. **Soltoff S; Carraway K; Prigent S; Gullick W; Cantley L.**ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14 (69): 3550-8.
207. **Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B.** Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. International Journal of Cancer 1994, 57:1-9

208. **Speel EJ.** HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Cause and Consequence. *Recent Results Cancer Res.* 2017;206:57-72.
209. **Spitz M, Fueger J, Goepfert H.** Squamous cell carcinoma of the aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 1988; 61: 203.
210. **Spitz, M.** Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminary of Oncology.* 1994; 21:281.
211. **Stiben M, Duarte-Franco E.** Human papilloma virus infection: Epidemiology an patophysiology. *Gynecology and Oncology.* 2007;107:S2-S5.
212. **Sweeny L, Dean N, Magnuson J, Carroll W, Helman E, Hyde S et al.** EGFR expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012;34(5):681-6.
213. **Syrjänen K.** HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *Journal of Clinical Pathology.* 2003;56:174–81.
214. **Syrjänen S.** Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology.* 2005;32S S59–S66.
215. **Syrjnen S.** Human papillomavirus infections and oral tumours. *Medical Microbiology and. Immunology.* 2003;192:123-128.
216. **Szekely L, Selivanova G, Magnusson K, Klein G, Wiman K.** EBNA-5, Epstein-Barr encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and proteins. *Proc Natl Acad SciUSA.* 1993; 90: 5455-5459.
217. **Tahan S, Neuberg D, Dieffenbach A, Yacoub L.** Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer.* 1993;71:3552-3559.
218. **Takada K and Nambo N.** The role of the EBERs in oncogenesis. *Seminary of Cancer Biology.* 2001; 11: 461-467.
219. **Thompson M, Aggarwal B, Shishodia S, Estrov Z, Kurzrock R.** Autocrine lymphotoxin production in Epstein-Barr virus-immortalized B cells: induction via NF-KB activation mediated by EBV-derived latent membrane protein 1. *Leukemia (Baltimore).* 2003; 17: 2196.

220. **Tjalma W, Weyler J, Bogers J, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts G, et al.** The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *European Journal of Obstetric Gynecology and Reproductive Biology*. 2001;97(2):223-30.
221. **Tommasino M, Accardi R, Caldeira S.** The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutations*. 2003;21:307-312.
222. **Torrente M, Rodrigo J, Haigentz M, Dikkers F, Rinaldo A, Glasg F, et al.** Human Papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Clinical review*. 2011;581-586.
223. **Tracy J, Mukand I, O'Leary M, Laver N, Wein R.** Bcl-2 Family Gene Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer and Clinical Oncology*. 2014; 3(1):11-16.
224. **Triantafillos L, Andrea S, Demetrios S, David V, Andrew J, John F.** p53 Mutations in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Predominate in a Subgroup of Former and Present Smokers with a Low Frequency of Genetic Instability. *Cancer Research*. 1997; 57:4070-4074.
225. **Ullrich A, Schlessinger J.** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61(2):203-212.
226. **Van der Geer P; Pawson T.** The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995; 20 (7): 277-80.
227. **Varmus H.** The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annals Review of Genetics* 1984;18:553-612.
228. **Veitía D, De Guglielmo Z, Ávila Maira, Liuzzi J, Correnti M.** Detección de VPH y Expresión de p53 en Carcinoma de Cabeza y Cuello. *Revista Venezolana de Oncología*. 2009;21(3):123-131.
229. **Veitía D, Liuzzi J, Ávila M, De Guglielmo Z, Correnti M.** Prevalence of HPV and EBV infection and their relationship with the p53 and PCNA expression in oral carcinoma patients. *Journal of Oral Research*. 2017; 6(4):86-91.

230. **Veitía D, Liuzzi J, Ávila M, De Guglielmo Z; Prado Z, Prado Y, Correnti M.** Human Papillomavirus detection in Head and neck squamous cell carcinoma. *ecancer medicalscience*. 2014;8:475-482.
231. **Veitía D, Liuzzi J, Correnti M, Ávila M, De Guglielmo Z, et al.** Detección de Virus Epstein Barr en Pacientes con Cáncer de Cabeza y Cuello. *Revista Venezolana de Oncología*. 2015;27(3):149-155.
232. **Venuti A, Manni V, Morello R.** Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *Journal of Medical Virology*. 2000;60:396–402.
233. **Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al.** Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *Journal of Medical Virology*. 2016; 88:336–344.
234. **Vogelstein B, Kinzler K.** p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992;70(4):523-526.
235. **Von Knebel Doeberitz M.** New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of Cancer* 2002, 38:2229-2242.
236. **Walker F, Kato A, Gonez L, Hibbs M, Pouliot N, Levitzki A, et al.** Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but no proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 1998; 18 (12): 7192-204
237. **Wang SS, Hildesheim A.** Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *Journal of Natatural Cancer*. 2003;31:35-40.
238. **Wangsa D, Ryott M, vall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J, et al.** Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *British Journal of Cancer* (2008) 99, 1121 – 1128.
239. **Welkoborsky H, Hinni M, Dienes H, Mann W.** Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Annals of Otorhinolaryngology and Laryngology*. 1995; 104: 503–510.

240. **Weg M, Altuna X, Weisman R, Rodriguez J.** Expression of protein tyrosine kinase in head and neck squamous cell carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2005;124:71-76.
241. **Wensing B and Farrell P.** Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbiology and Infectology*. 2000; 2: 77-84.
242. **Wiernik G, Millard P, Haybittle J.** The predictive value of histological classification into degrees of differentiation of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx compared with the survival of patients. *Histopathology*. 1991;19: 411–417.
243. **Wood K; Sarnecki C; Roberts T; Blenis J.** ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*, 1992; 68 (6): 1041-50.
244. **Worden F, Urba S, Bradford C, Lee J, Wolf G, Cordell K, et al.** Chemoselection As a Strategy for Organ Preservation in Advanced Oropharynx Cancer: Response and Survival Positively Associated With HPV16 Copy Number. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3138-3146
245. **Xie M, Xiao J, Tao Z, Luo J.** Preliminary study on p53 gene expression and infection of Human Papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma. *Human I Ko Ta Hsueh Hasueh Pao*. 1997;22:209-211.
246. **Yang H, Cho Y, Kim H, Chang M, Sung M, Kim W.** Association of p53 and BCL-2 expression with Epstein-Barr virus infection in the cancers of head and neck. *Head Neck*. 200;23(8):629-36.
247. **Young L and Murray P.** Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumors. *Oncogene*. 2003; 22: 5108-5121.
248. **Zhang D, Zhang Q, Zhou L, Huo L, Zhang Y, Shen Z, et al.** Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus- 16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study. *BMC Cancer*. 2010; 10:650-658.