



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
BIOQUÍMICA CLÍNICA

ESTUDIO DE BIOMARCADORES CON VALOR PRONÓSTICO EN CARCINOMA DE OROFARINGE (CAOF) Y SU RELACIÓN CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. DIEGO OCTAVIO REYES HERNÁNDEZ

TUTORES:

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. JOAQUÍN MANZO MERINO
CONACyT-INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

DICIEMBRE 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, particularmente, el trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos y el Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer pertenecientes a la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) bajo la supervisión de la Dra. Marcela Lizano Soberón y el Dr. Joaquín Manzo Merino.

Este proyecto fue aprobado los Comités Científico y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología, referencias (015/039/IBI) y (CEI/998/15). Así mismo, fue parcialmente financiado por el Instituto Nacional de Cancerología Ref: (015/039/IBI)(CEI/998/15), por el CONACyT Ref: FOSIS-261499 y por el "PRONAI-7-VIRUS Y CÁNCER" Ref: 303044.

El comité tutorial del proyecto estuvo conformado por:

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de investigaciones biomédicas

Dr. Joaquín Manzo Merino
CONACyT-Instituto Nacional de Cancerología

El jurado asignado para el examen de grado de Maestro en Ciencias se conformó por:

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta – *Presidenta*
Facultad de Odontología, UNAM.

Dra. Sara Huerta Yépez – *Secretaria*
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México
"Federico Gómez".

Dra. Leticia Rocha Zavaleta – *Vocal*
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Dulce González Islas – *Vocal*
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

Dra. Marcela Lizano Soberón – *Vocal*
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca nacional de manutención con registro de CVU 638768, este apoyo contribuyó a culminar mi formación profesional.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) que facilitó mi participación en el *"DNA Tumour Virus Meeting 2019"* llevado a cabo en Trieste, Italia.

Al comité tutor conformado por la Dra. Marcela Lizano Soberón y el Dr. Joaquín Manzo Merino, les agradezco que me hayan recibido en sus respectivos grupos de investigación, al infinito el apoyo y confianza que me brindaron, trabajar bajo su directriz me permitió desarrollarme en lo científico, sin embargo, el crecimiento personal también es debido a su calidez humana que tanto los distingue. Toda mi admiración por los dos.

Al Dr. Roberto Jiménez Lima por compartirme de su tiempo y su conocimiento en cuestiones de estadística, metodología y clínica; su colaboración en el presente proyecto fue parte medular.

Al Dr. Carlo Cesar Cortés González del Departamento de Microscopía de la Unidad de Investigación Biomédica de la UNAM con sede en el INCan por su invaluable apoyo y consejos para el proyecto.

A la Dra. Ana María Cano Valdéz por el consejo, profesionalismo y tiempo dedicado para la interpretación de los marcadores evaluados en el trabajo, asimismo, su intervención en la recolección de los casos.

Al histotecnólogo José Marín de Jesús Marín Aquino por facilitar cortes para la evaluación de los marcadores, así como, todos los consejos para el procesamiento de estos.

A cada uno de los miembros del jurado por todos los comentarios y sugerencias que permitieron enriquecer este proyecto de tesis.

A los miembros del Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos por todas las enseñanzas, comentarios y sugerencias que enriquecieron el proyecto.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Minerva y Lorenzo, mis más grandes ejemplos de amor, superación y perseverancia. Siempre me han impulsado a nunca rendirme, todo lo que soy hasta el día de hoy es gracias a ustedes.

A mis hermanos, Oliver y César, sin lugar a duda ser el hermano pequeño de este par ha sido lo mejor que me ha pasado en la vida. Ustedes también han sido un gran ejemplo de superación. Siempre estaremos juntos.

A mis amigos del "Lab 2 y 3": Joaq , Josué, Adri, Katy, Mashe, Alicia, Alex, Ara, Iris, Omar, Liz, Les y Lalo; agradezco a todos los consejos para mi proyecto, la disposición por resolver mis dudas, pero también todos los momentos agradables esos nunca faltaron. Somos una gran familia.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 CÁNCER	12
1.2 CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	13
1.3 LA CAVIDAD OROFARÍNGEA	16
1.3.1 <i>Histología de la OF</i>	17
1.4 CÁNCER DE OROFARINGE	19
1.4.1 <i>Etiología del CaOF</i>	20
1.5 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	26
1.5.1 <i>El Ciclo Viral</i>	28
1.5.2 <i>Mecanismo Oncogénico del VPH</i>	31
2. ANTECEDENTES	32
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. HIPÓTESIS	35
6. OBJETIVOS	36
6.1 GENERAL	36
6.2 PARTICULARES	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	36
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	36
7.3 LUGAR DE ESTUDIO	36
7.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	37
7.5 FINANCIAMIENTO Y APROBACIÓN	37
7.6 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA GENERAL DEL ESTUDIO	37
7.6.1 <i>Generación de una base de datos con casos de CaOF</i>	37
7.6.2 <i>Determinación de la presencia y el tipo de VPH en muestras de pacientes con CaOF</i>	38
7.6.3 <i>Estandarización de la técnica de detección múltiple para las proteínas candidatas mediante inmunofluorescencia indirecta</i>	41
7.6.4 <i>Validación de la expresión de proteínas candidatas mediante inmunohistoquímica</i>	43
7.6.5 <i>Análisis Estadístico</i>	45
8. RESULTADOS	47
8.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO: CARACTERÍSTICAS BASALES Y CLINICOPATOLÓGICAS	47
8.2 PRESENCIA Y TIPO VIRAL	51
8.3 DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS EN CASOS CON DIAGNÓSTICO DE CAOF	52
8.4 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA ..	56
8.5 RELACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL CON LA PRESENCIA DE VPH Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CANDIDATAS MEDIANTE IFI EN CAOF	57
8.6 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CANDIDATAS EN CAOF Y SU RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL	63
8.6 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CANDIDATAS EN CAOF Y SU RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	66
9. DISCUSIÓN	70
10. CONCLUSIONES	75
11. BIBLIOGRAFÍA	76
12. ANEXOS	82



12.1 APROBACIÓN DE COMITÉ TUTOR	82
12.2 APROBACIÓN POR LOS COMITÉS CIENTÍFICO Y DE ÉTICA INSTITUCIONALES	83
12.3 PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS	85
12.4 PRESENTACIÓN DE TRABAJOS EN CONGRESOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD RESPECTO A SITIO ANATÓMICO DE HNC A NIVEL MUNDIAL DURANTE 2018 PARA AMBOS SEXOS.	14
TABLA 2. ESTIMACIÓN INCIDENCIAS DE CAOF Y SU CAMBIO PARA LOS SIGUIENTES AÑOS EN MÉXICO PARA AMBOS SEXOS.	19
TABLA 3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS ENTIDADES EN EL DIAGNÓSTICO DE CAOF.....	23
TABLA 4. NEOPLASIAS CAUSADAS POR EL VPH.	27
TABLA 5. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN POR INICIADOR.....	39
TABLA 6. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN POR INICIADOR.....	40
TABLA 7. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN PARA EL KIT "MPCR KIT FOR HUMAN PAPILLOMA VIRUS SET 2".....	40
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y BASALES.....	50
TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO.....	50
TABLA 10. PRESENCIA VIRAL DETERMINADA.	51
TABLA 11. TIPOS VIRALES DETERMINADOS.....	51
TABLA 12. DISTRIBUCIÓN DE LAS INTENSIDADES POR MARCADOR (IFI) Y SU EXPRESIÓN ASOCIADA A LA PRESENCIA VIRAL.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS (HALLMARKS) DEL CÁNCER.	12
FIGURA 2. ETAPAS DEL PROCESO CARCINOGENICO.	13
FIGURA 3. DISPOSICIÓN ANATÓMICA DE LAS NEOPLASIAS QUE COMPONEN AL GRUPO DE HNC.....	13
FIGURA 4. TASAS DE INCIDENCIA DE HNC PARA AMBOS SEXOS A NIVEL MUNDIAL DURANTE 2018.....	15
FIGURA 5. ANATOMÍA DE LA OROFARINGE.....	16
FIGURA 6. HISTOLOGÍA DE LA OF.....	18
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA PROYECCIÓN DE LA INCIDENCIA ESTIMADA PARA CAOF PARA AMBOS SEXOS EN MÉXICO.	20
FIGURA 8. DIVERSIDAD DE TIPOS VIRALES QUE AFECTAN AL HUMANO.	26
FIGURA 9. ESTRUCTURA Y ARREGLO GENÓMICO DEL VPH.	28
FIGURA 10. ESQUEMATIZACIÓN DEL CICLO VIRAL EN UN EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO.....	28
FIGURA 11. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE IFI.	42
FIGURA 12. DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS INTENSIDADES DE IFI.	43
FIGURA 13. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE IHQ.....	44
FIGURA 14. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE IHQ.....	45
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS INCIDENCIAS PARA CAOF REPORTADAS EN EL INCAN DURANTE 2005-2017.	47
FIGURA 16. DIAGRAMA DE TRABAJO DEL PRESENTE PROYECTO.	48
FIGURA 17. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA PREVALENCIA VIRAL.	48
FIGURA 18. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN VIRAL EN CASOS DE CAOF.....	52
FIGURA 19. RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN MÚLTIPLE MEDIANTE IFI.	55
FIGURA 20. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MEDIANTE IHQ.....	56



FIGURA 21. CURVA DE SG DE LA COHORTE ANALIZADA.	57
FIGURA 22. CURVA DE SG DE LA COHORTE ANALIZADA RESPECTO A LA PRESENCIA VIRAL.	57
FIGURA 23. CURVA DE SG DE LA COHORTE ANALIZADA RESPECTO AL ESTRÉS OXIDANTE.....	58
FIGURA 24. CURVA DE SG Y LA EXPRESIÓN DE B -CATENINA.	59
FIGURA 25. CURVA DE SG Y LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA 1.....	60
FIGURA 26. SG Y LA EXPRESIÓN DE CLAUDINA 4.....	61
FIGURA 27. SG Y LA EXPRESIÓN DE EGFR.....	62
FIGURA 28. EXPRESIÓN DE P16 MEDIANTE IHQ Y SU RELACIÓN CON LA SG.....	63
FIGURA 29. EXPRESIÓN DE B -CATENINA MEDIANTE IHQ Y SU RELACIÓN CON LA SG.	64
FIGURA 30. EXPRESIÓN DE CLAUDINA 4 MEDIANTE IHQ Y SU RELACIÓN CON LA SG.....	64
FIGURA 31. EXPRESIÓN DE EGFR MEDIANTE IHQ Y SU RELACIÓN CON LA SG.	65
FIGURA 32. CURVA DE SLE PARA LOS 23 CASOS RESPONDEDORES DE CLÍNICA COMPLETA.....	66
FIGURA 33. CURVA DE SLE EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA VIRAL.....	67
FIGURA 34. CURVA DE SLE Y LA EXPRESIÓN DE P16.....	67
FIGURA 35. CURVAS DE SLE Y LA EXPRESIÓN DE LOS DIFERENTES MARCADORES PROPUESTOS.....	69



RESUMEN

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común a nivel mundial, de tal suerte que para 2018 fueron registrados más de 800,000 nuevos casos. El consumo de alcohol y tabaco contribuye al desarrollo de carcinoma de orofaringe (CaOF), no obstante, la infección por el Virus del Papiloma humano (VPH) es ahora considerada un factor independiente para el desarrollo de esta neoplasia, dando pie al reconocimiento de dos entidades en el diagnóstico de CaOF: casos *VPH-positivos*, los cuales se relacionan a la infección del virus y casos *VPH-negativos*, primordialmente asociados al abuso en el consumo de alcohol y tabaco. Estos dos subgrupos cuales presentan características únicas de acuerdo con su biología, epidemiología, terapéutica y aun más importante, su pronóstico.

Existen evidencia indicando que la mera detección de la presencia viral o la detección del marcador subrogado p16 no es suficiente para predecir el desenlace clínico de los pacientes con CaOF, debido a que algunos casos VPH-positivos no presentarán una favorable respuesta al tratamiento. Es por lo que se ha visto la necesidad de analizar diversos marcadores de manera simultánea que pudieran revelar el panorama molecular de esta entidad o que de alguna manera se vean involucrados en la resistencia a la terapia. Una manera de llevar a cabo dicho objetivo es mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual garantiza un rango dinámico más amplio de modo que la detección es más sensible permitiendo observar marcadores de menor concentración. En este trabajo se llevó a cabo la detección de los diferentes marcadores (β -Catenina, Caveolina 1, Claudina 4, CellRox, EGFR, DNA/RNA Damage y p16) empleando dicha metodología (IFI), paralelamente, haciendo uso de inmunohistoquímica (IHQ) se realizó la validación de algunos marcadores (β -Catenina, Claudina 4, EGFR, y p16).

De manera importante, al realizar el análisis de la supervivencia global (SG) en función a la presencia viral se halló diferencia estadísticamente significativa ($*p=0.037$) indicando que aquellos pacientes VPH-positivos exhibieron un mayor tiempo de SG. Concretamente y respecto a los marcadores propuestos empleando IFI, se estableció que no existe asociación entre la presencia viral, la supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE). Al analizarse la expresión de los marcadores mediante IHQ se encontró



que una alta expresión de EGFR logró impactar de manera significativa a la SG (* $p=0.031$) pero al determinarse el riesgo relativo HR= 2.19 (IC 95%: 0.85 – 5.63) se concluyó que no es una herramienta con valor pronóstico. Destacablemente, la positividad a p16 presentó asociación significativa tanto para la SG como para la SLE, con un HR de 0.29 (IC 95%: 0.11 – 0.80) y un HR de 0.10 (IC 95%: 0.10 – 0.95), respectivamente. Dichos resultados reflejan la utilidad clínica que tiene el análisis de la expresión de p16 no solo para SG que ya ha sido documentado sino para dar seguimiento a aquellos casos con éxito terapéutico y poder predecir la recurrencia de estos.



ABSTRACT

Head and neck cancer (HNC) is the sixth most common cancer worldwide, with more than 800,000 new cases registered annually (2018). Alcohol and tobacco consumption contribute to the development of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC); however, infection with the human papillomavirus (HPV) is now considered an independent factor in the development of this neoplasm, leading to the recognition of two entities in the diagnosis of OPSCC: *HPV-positive* cases, induced by this virus, and *HPV-negative* cases, primarily associated with alcohol and tobacco abuse. These two subgroups present unique characteristics according to their biology, epidemiology, therapeutics and most importantly, their prognosis.

There is evidence indicating that the mere detection of viral presence or detection of p16, a surrogate marker for HPV infection is not sufficient to predict the outcome of OPSCC patients, because some HPV-positive cases will not have a favorable response to treatment. Thus, it has been necessary to analyze several markers simultaneously that could reveal the molecular picture of this entity or that are somehow involved in resistance to therapy. In order to carry out this objective, an indirect immunofluorescence (IIF) approach was used, this technique ensures a wider dynamic range so that the detection is more sensitive allowing the detection of markers present at lower concentrations. In this work, the detection of the different protein markers (β -Catenin, Caveolin 1, Claudin 4, CellRox, EGFR, DNA/RNA Damage and p16) was carried out using this methodology (IIF), at the same time, the validation of some markers (β -Catenin, Claudin 4, EGFR, and p16) was performed using immunohistochemistry (IHC).

Importantly, when testing overall survival (OS) according to viral presence, a significant difference was found ($*p=0.037$) indicating that those HPV-positive patients exhibited a longer OS time. The other protein markers proposed using IIF, it was established that there is showed no association with viral presence, OS and disease-free survival (DFS). When analyzing the expression of the markers by IHQ, it was found that a high expression of EGFR had an impact on on OS ($*p=0.031$) but when the hazard ratio was determined, 2.19 (95% CI: 0.85 - 5.63), it was concluded that it is not a tool marker for prognosis. Notably, p16 positivity presented significant association for both OS and DFS, with an HR of 0.29 (95%



CI: 0.11 - 0.80) and 0.10 (95% CI: 0.10 - 0.95), respectively. These results reflect the clinical usefulness of p16 expression analysis not only for OS that has already been documented but also for following up those cases with therapeutic success and being able to predict their recurrence.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

Consiste en un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí que afectan cualquier región del organismo, su principal característica es el crecimiento y proliferación celular desordenado, que por lo general con la capacidad de diseminación o invasión a distintas regiones dando lugar a metástasis (Organización Mundial de la Salud, 2018). La etiología del cáncer es multifactorial; sin embargo, clasificadas en: a) *carcinógenos físicos* (p. ej. radiaciones ultravioletas e ionizantes), b) *carcinógenos químicos* (p. ej. alcohol, arsénico, componentes del cigarro, aflatoxinas, entre otros) y por último, c) *carcinógenos biológicos* (p. ej. bacterias, parásitos y virus) (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). Estos agentes pueden inducir la expresión de algunos oncogenes y dar paso a la inhibición de genes supresores de tumores alterando el ciclo y la proliferación celular propiciando un entorno denominado carcinogénesis (**Figura 1**) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Así el proceso carcinogénico es el resultado de la exposición a uno o a la combinación a los agentes etiológicos previamente mencionados, donde en dicho evento se ve afectada una célula normal o un grupo de ellas dando lugar a la acumulación de daños que no fueron exitosamente reparados por los mecanismos celulares que finalmente permiten el establecimiento del cáncer. Debido a su complejidad y para lograr la comprensión de este proceso, se han logrado reconocer tres etapas: *iniciación*, *promoción* y *progresión* (**Figura 2**) (De Martín Civetta & Civetta, 2011; Hlatky & Hahnfeldt, 2014).

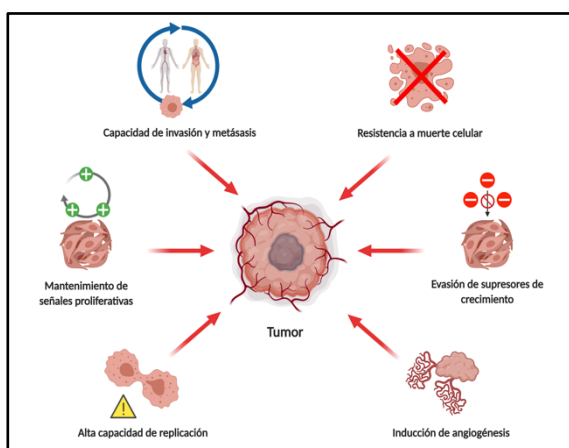


Figura 1. Características distintivas (Hallmarks) del cáncer.

Los fenotipos adquiridos durante el proceso de desarrollo tumoral son: mantenimiento de señales proliferativas, capacidad de invasión y metástasis, resistencia a muerte celular, evasión de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y alta capacidad de replicación. Estos mecanismos desregulados confieren ventajas a las células tumorales permitiendo su establecimiento y posterior mantenimiento. La clasificación de estos fenotipos permite el estudio racionalizado de esta compleja enfermedad. (Tomado y modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

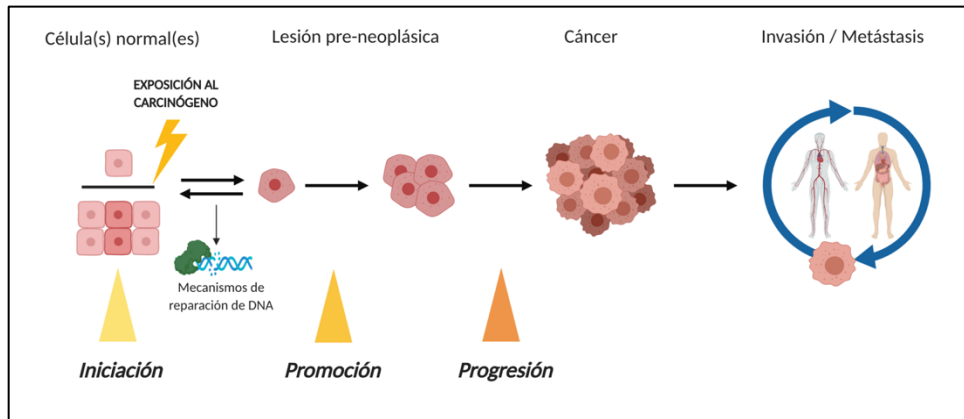


Figura 2. Etapas del proceso carcinogénico.

Una célula normal o un grupo de ellas sufre un daño a nivel genético y/o epigenético después de la exposición a algún carcinógeno (físico, químico o biológico); si los mecanismos de reparación no logran reponer el daño el daño genético se acumulará en cada ciclo de replicación celular dando lugar a una selección clonal alterada siendo esto un reflejo de un desbalance entre la muerte y supervivencia celular, a este proceso se le conoce como iniciación. La etapa siguiente se define como promoción, en ella participan factores de crecimiento (ligandos o receptores) así como mecanismos angiogénicos permitiendo a la célula proliferar sin control. Los tumores benignos solo cuentan con las dos primeras etapas y cuentan con un crecimiento controlado. Por último, la progresión es la capacidad de invadir tejidos vecinos o distantes a través del torrente sanguíneo o linfático, proceso que involucra la degradación de la matriz extracelular mediante metaloproteasas (Tomado y modificado de Hlatky & Hahnfeldt, 2014).

1.2 Cáncer de Cabeza y Cuello

El cáncer de Cabeza y Cuello consiste en el conjunto de neoplasias malignas desarrolladas en la región cervicofacial o aerodigestiva superior (*Head and Neck Cancer*, por sus siglas en inglés **HNC**.) (**Figura 3**) (Cramer et al., 2019). Alrededor del 95% de los casos de HNC corresponde al carcinoma de células escamosas que se desarrollan a partir del epitelio estratificado escamoso no queratinizado, el cuál reviste las mucosas de la región cervicofacial y con menor frecuencia a tumores de origen glandular (**Tabla 1**) (Galbiatti et al., 2013; Schoenfeld, 2015; Gallegos-Hernández, 2016).

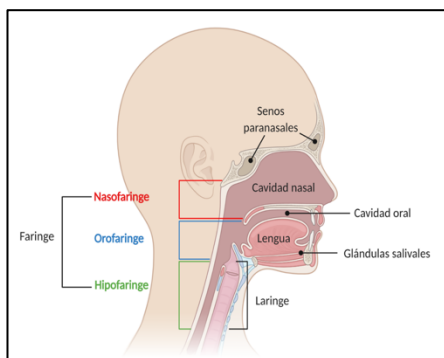


Figura 3. Disposición anatómica de las neoplasias que componen al grupo de HNC.

Este grupo heterogéneo de neoplasias comprende múltiples zonas subanatómicas como: cavidad oral, laringe, faringe (así mismo sub-divididas en: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), glándulas salivales, cavidad nasal y senos paranasales (Imagen tomada y modificada de Instituto Nacional del Cáncer, 2015) <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello>



De todos los tipos de cáncer que afectan a la población, el HNC es uno de los más prevalentes y letales, ocupando el sexto lugar de incidencia alrededor del mundo con una supervivencia asociada a 5 años del 49% (Cramer et al., 2019). En 2018 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency of Research on Cancer*, por sus siglas en inglés IARC) mediante su sitio interactivo Globocan, reportaron una incidencia aproximada de 891,659 casos al año para ambos sexos a nivel mundial. De manera importante, este conjunto de neoplasias representa una mortalidad estimada del 50 % (453,307 decesos) (Tabla 1) (Ferlay et al., 2018). Resulta de gran importancia conocer que el pronóstico y tratamiento de los pacientes que son diagnosticados con HNC en función de los agentes carcinogénicos a los que se estuvo expuesto, localización anatómica y el estadio clínico al momento del diagnóstico (Chow, 2020).

Tabla 1. Incidencia y mortalidad respecto a sitio anatómico de HNC a nivel mundial durante 2018 para ambos sexos.

SITIO DEL CÁNCER	INCIDENCIA			MORTALIDAD		
	Casos	Mujeres	Hombres	Casos	Mujeres	Hombres
<i>Cavidad oral y labio</i>	358,864	108,444	250,420	177,384	57,691	119,693
<i>Hipofaringe</i>	80,608	13,112	67,496	34,984	5,569	29,415
<i>Laringe</i>	177,422	22,445	154,977	94,771	12,965	81,806
<i>Nasofaringe</i>	129,079	35,663	93,413	72,987	18,707	54,280
<i>Orofaringe</i>	92,887	18,415	74,472	51,005	8,889	42,116
<i>Glándulas salivales</i>	52,799	23,543	29,256	22,176	8,736	13,440
HNC global	891,659	221,622	670,034	453,307	112,557	340,750

Tomado y modificado de Ferlay et al., 2018.

La incidencia de HNC tiene un comportamiento diferente en relación con su distribución geográfica, logrando ser de moderada a alta en países desarrollados de los continentes de América, Asia, Europa y Oceanía (Figura 4) (Soave, 2013).

El HNC comprende un grupo heterogéneo de neoplasias que se desarrollan en distintos subsitios anatómicos, por ello los factores de riesgo difieren entre sí (Simard, Torre, & Jemal, 2014). Está documentado que los principales factores de riesgo para el desarrollo de HNC se encuentran asociados a componentes sociodemográficos y culturales, por ejemplo, el simultáneo consumo de alcohol y tabaco contribuye en un 75% para el desarrollo de esta enfermedad (Argiris et al., 2008; Hashibe et al., 2009), el porcentaje restante es atribuido a otras formas de consumo de tabaco, entre otros factores (Jethwa & Khariwala, 2017). Particularmente en Europa, el consumo de tabaco es inhalado (conocido como rapé);



respecto al sureste Asiático y la región de Oceanía este es masticado y se le denomina buyo o betel, producto catalogado como carcinógeno de Grupo 1 por la IARC, siendo este el resultado de una mezcla constituida por nuez areca, hoja de palmera de betel y tabaco curado (IARC, 2012).

Dentro de los agentes carcinogénicos biológicos existen: la infección por el Virus del Papiloma humano (VPH) o por el Virus de Epstein-Barr (EBV) asociados al desarrollo de neoplasias sitio específico, el VPH se asocia al cáncer de orofaringe mientras que el EBV es más prevalente en nasofaringe (Holmes & Wenig, 2019). En conclusión, todos estos factores contribuyen al desarrollo de alguno de los tumores que constituyen el conjunto de HNC, por lo que es considerada una enfermedad multifactorial (Van Monsjou et al., 2013; Cramer et al., 2019; Cottrill et al., 2020).

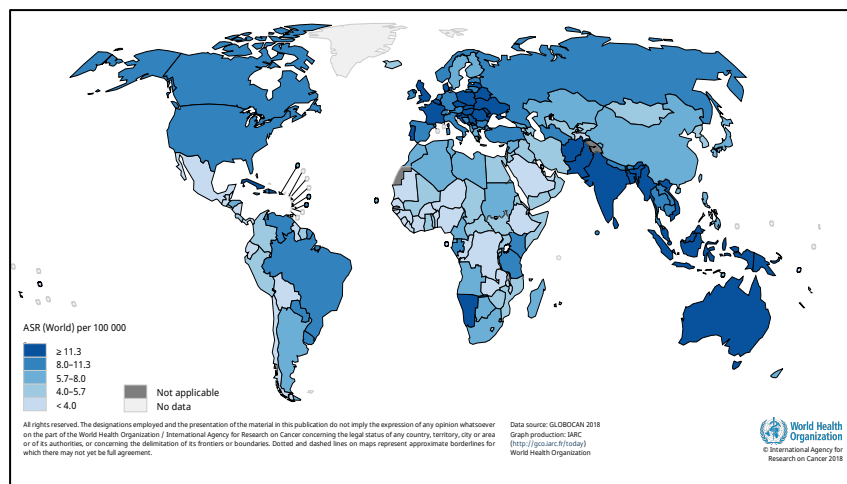


Figura 4. Tasas de incidencia de HNC para ambos sexos a nivel mundial durante 2018.

La incidencia de estas neoplasias tiene un comportamiento heterogéneo, esto en relación con su distribución geográfica. Los principales factores de riesgo son: el consumo de alcohol, diversas maneras del consumo de tabaco (fumado, masticado o inhalado), una deficiente higiene bucal, inmunosupresión, la infección por el Virus del Papiloma humano (VPH) o por el Virus de Epstein-Barr (EBV). En regiones como el sur y sureste de Asia, así mismo el continente de Oceanía se registró una tasa de 22.3 casos*; de manera similar, en el continente europeo, su porción occidental y oriental, presentaron una tasa de 20 casos*. En cambio, la región norte de América se estimó una tasa 18.6 casos*, sin embargo, en Latinoamérica y el Caribe solo fueron registrados 8.7 casos*. (Tomado y modificado de Ferlay et al., 2018; Hashim, et al., 2019).

**número de casos ajustados por edad y presentados por cada 100,000 habitantes.*



1.3 La Cavidad Orofaringea

Durante mucho tiempo la cavidad oral (CO) y la región de la orofaringe (OF) habían sido consideradas como una única entidad, 1) debido a su cercanía y 2) siendo que ambas se encuentran recubiertas por un epitelio estratificado no queratinizante que se extiende de manera ininterrumpida confinando a dichos subsitios a única entidad, así que, convenientemente las neoplasias que se originaban en estas zonas eran catalogadas como cáncer de cavidad oral (CCO), de modo que, resulta importante distinguir que entre ambas regiones existen diferencias sustanciales, como lo es la presencia de tejido linfoide especializado presente en la OF, en contraste, a la CO (Gelwan et al., 2017).

Respecto a la disposición anatómica, la CO es destacada por la boca, a su vez esta región se delimita en la parte anterior por los labios y en la zona posterior por la OF. En la porción superior, se ubica el paladar duro y respecto a la parte inferior, se encuentran los dos tercios anteriores de la lengua (cuerpo de la lengua), además se contemplan los arcos maxilares que componen el sistema dentario o aparato masticador que se encuentra rodeado por la mucosa bucal que recubren la parte interior de las mejillas (Souza et al., 2015).

Por otra parte, la OF conforma la parte media de la faringe situándose entre la nasofaringe y la hipofaringe; así mismo, dicha región se ubica inmediatamente después de la CO como se muestra en la **Figura 5a**. Los cuatro constituyentes de la OF son: *la base de la lengua o tercio posterior de la lengua (Base of Tongue, o por sus siglas en inglés BOT)*, *las amígdalas, el paladar blando y la pared posterior de la faringe (Figura 5b)* (Duvvuri & Myers, 2009; Fossum et al., 2017).

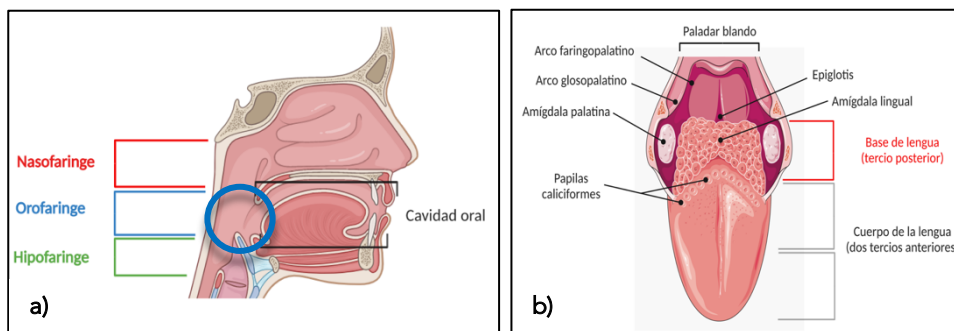


Figura 5. Anatomía de la orofaringe.

a) La OF (delimitado por el círculo azul) se encuentra inmediatamente después de la CO, a su vez, situada entre la nasofaringe y la hipofaringe. **b)** La OF está constituida por los siguientes cuatro elementos: *la base de la lengua (tercio posterior de la lengua o por sus siglas en inglés BOT)*, *las amígdalas*, ya sea en su porción lingual o palatina, *el paladar blando* ubicado en la parte superior delimitando la CO de la OF y por último, *la pared posterior de la faringe* que se sitúa posterior a BOT y conecta con la epiglotis (Duvvuri & Myers, 2009; Fossum et al., 2017).



1.3.1 Histología de la OF

El tejido amigdalino se encuentra recubierto por un epitelio estratificado escamoso no queratinizante similar al que recubre la CO (**Figura 6a**) (Gelwan et al., 2017). Además, se distinguen sitios donde el tejido conectivo delimita propiamente a los nódulos linfáticos; sin embargo, las áreas conocidas como criptas presentan un arreglo distinto donde se observa la coexistencia del tejido epitelial, el cual es apenas distinguible, con células del sistema inmune, dando como resultado la denominación de linfoepitelio (**Figura 6b**) (Ogra, 2000). Así mismo, las amígdalas (linguales y/o palatinas) son consideradas órganos linfoides secundarios (Ruddle & Akirav, 2009), donde subepitelialmente existen numerosos centros germinales constituidos por un área central de linfocitos B rodeados por linfocitos T; además, cohabitan otras estirpes de células del sistema inmune como macrófagos donde su presencia va en aumento en períodos de intensa presentación antigénica (**Figura 6d**) (Michaels, 1990). La formación de las criptas es una característica importante en este tipo de tejido, dichas estructuras se constituyen por un epitelio reticulado (carente de una estructura laminar ordenada presentándose de una manera discontinua) que se invagina profundamente hasta hacer contacto con el tejido linfoide (**Figura 6c y d**) (Sorenson & Clark Brelje, 2014). De manera importante, la región aerodigestiva superior es una de vía de acceso para diferentes patógenos, por consiguiente, las amígdalas juegan un papel importante en el reconocimiento antigénico. Se ha descrito que cada amígdala cuenta aproximadamente con 10 a 30 criptas (Perry & Whyte, 1998) cuya finalidad es aumentar la superficie de contacto alrededor de 300 cm² por estructura (Howie, 1980).

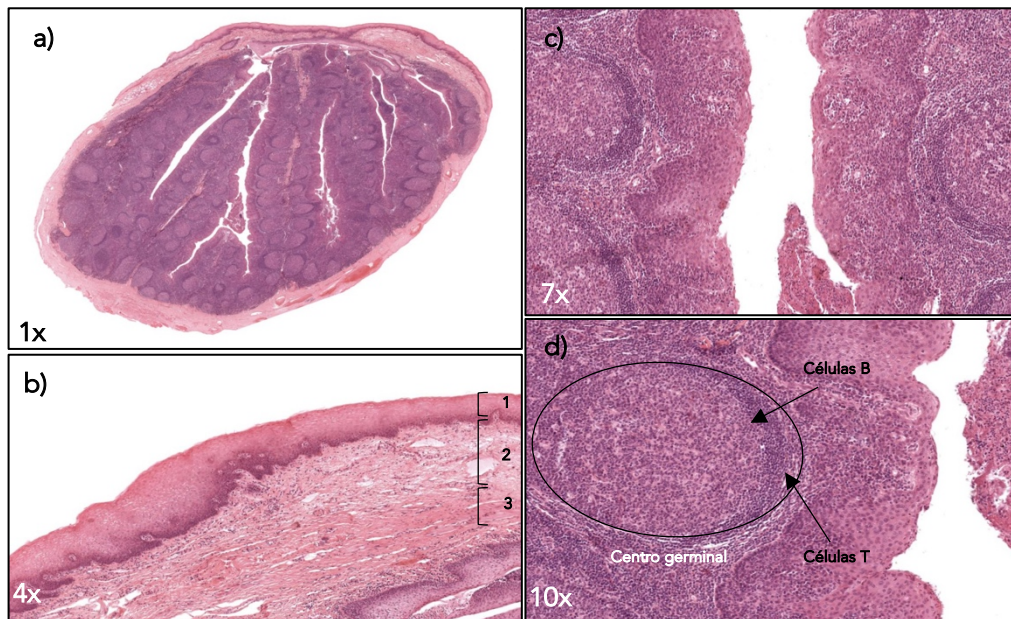


Figura 6. Histología de la OF.

a) Corte transversal de una amígdala normal teñida con H&E. **b)** El epitelio estratificado escamoso no queratinizante presente en la capa superficial **(1)**, por debajo de esta se encuentra la submucosa **(2)** y el tejido conectivo **(3)**. **c)** En las criptas, el epitelio reticulado tiene un mayor componente de células basales y logra ser infiltrado por células del sistema inmune. **d)** Los nódulos linfoides se muestran como agregaciones esféricas, en el centro se observan los centros germinales, al interior se localizan células B y en su periferia las células T. Imágenes tomadas de: <http://www.histologyguide.com/index.html>

Del conjunto de los tumores que se desarrollan en la región aerodigestiva superior, los de la CO y la OF representan un 50.66% de este conjunto de neoplasias, mostrando una incidencia estimada de 451,751 casos y una mortalidad de 228,389 casos a nivel mundial (Ferlay et al., 2019). Esta alta proporción puede ser atribuida al hecho de que el tejido epitelial de la superficie de ambos subsitios es continuo, compartido e ininterrumpido, y altamente expuesto a factores carcinogénicos derivados del estilo de vida y/o medioambientales. De manera que se reconoce que ambas patologías, cáncer de CO y OF, comparten factores de riesgo históricamente conocidos, como el consumo de alcohol y tabaco (Hashibe et al., 2007; IARC, 2012; Kawakita & Matsuo, 2017). Sin embargo, en los últimos años se ha establecido un nuevo factor de riesgo de origen biológico, la infección por el Virus del Papiloma humano (VPH) que contribuye en el desarrollo de CaOF (Ang et al., 2010; Chaturvedi et al., 2011).

Derivado de la evidencia respecto a los factores de riesgo para el desarrollo de ambas neoplasias, la OMS reconoció a ambas entidades de manera individual definiéndolas como cáncer de la región oral y de la orofaringe en 2017, propiamente y aún más importante, se distinguieron los factores de riesgo asociados a cada neoplasia (Westra & Lewis, 2017). Por lo que resulta importante diferenciar ambas neoplasias debido a que presentan un sitio



específico donde se desarrolla la carcinogénesis, su manejo clínico es diferente, así como su epidemiología y pronóstico (Gelwan et al., 2017).

1.4 Cáncer de Orofaringe

Del subconjunto de neoplasias desarrolladas en la OF, el tipo histológico más prevalente es el carcinoma de células escamosas y por lo que se referirá como **CaOF**. Dicho tipo histológico representa la gran mayoría (90 %) de los tumores que surgen del epitelio escamoso que recubre los cuatro subsitios distintivos de la OF: *BOT*, *amígdalas*, *paladar blando* y *pared posterior de la faringe* (Pai & Westra, 2009; Fossum et al., 2017;).

Durante 2018 a nivel mundial se registraron aproximadamente 90,000 nuevos diagnósticos, particularmente el sexo masculino se vio mayormente afectado por esta neoplasia con una relación de incidencia de 4:1 respecto al sexo femenino (Johnson & Amarasinghe, 2016; Ferlay et al., 2019). En México se presenta un comportamiento similar entre ambos sexos (3 hombres por cada mujer); sin embargo, hoy en día el número de casos no es alarmante pero las proyecciones para los siguientes años resultan de especial interés. En la **Tabla 2**, se muestra el cambio expresado en porcentaje para el año 2040, donde la incidencia se verá incrementada hasta en un 108.2 % para hombres y 109.9% para mujeres con respecto al 2018 (**Figura 7**), posicionando a este cáncer como un potencial riesgo para la población en general (Ferlay et al., 2019).

Tabla 2. Estimación incidencias de CaOF y su cambio para los siguientes años en México para ambos sexos.

PROYECCIÓN DE INCIDENCIAS ESTIMADAS POR AÑO (CAMBIO EXPRESADO EN PORCENTAJE)						
SEXO	2018	2020	2025	2030	2035	2040
Hombres	331	353 (+6.6%)	423 (+27.8%)	499 (+50.8%)	589 (+77.9%)	689 (+108.2%)
Mujeres	111	117 (+5.4%)	136 (+22.5%)	162 (+45.9%)	193 (+73.9%)	233 (+109.9%)

*Datos obtenidos y modificados de: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.

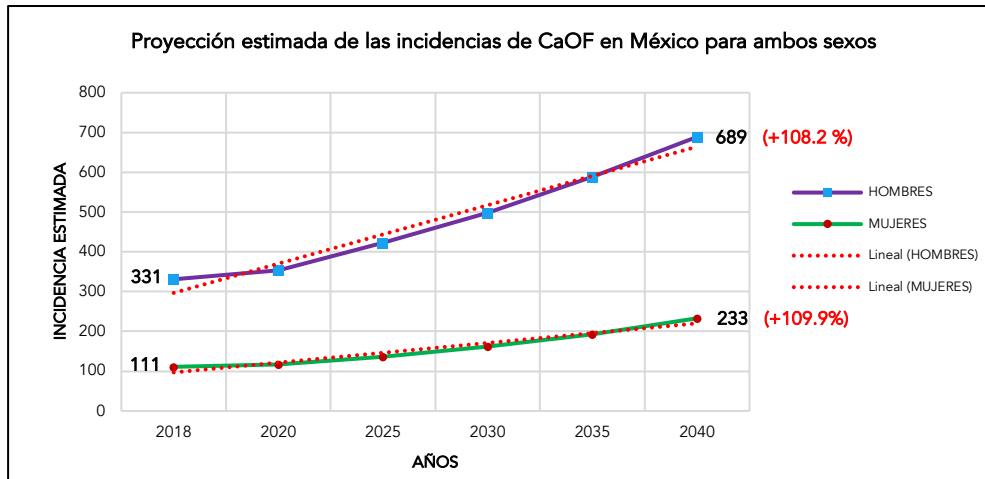


Figura 7. Representación gráfica de la proyección de la incidencia estimada para CaOF para ambos sexos en México. La relación incidente entre hombres y mujeres se muestra estable en el periodo comprendido del año 2018 al 2040, sin embargo, para el año 2040 se podrá observar un incremento de la incidencia donde se estima un incremento significativo, de un 108.2% para el género masculino y un 109.9% para el femenino. Datos obtenidos de: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>

1.4.1 Etiología del CaOF

Se ha establecido que el humo del cigarro es nocivo para la salud humana debido a que contiene alrededor de 5,000 compuestos químicos potencialmente carcinogénicos (Stedman, 1968; Talhout et al., 2011). Sin embargo, hasta ahora únicamente alrededor de 60 de estos han sido ya reconocidos como tales por su relación causal con diferentes tipos de cáncer (pulmón, laringe, cavidad oral, faringe, esófago, páncreas, vejiga, riñón, cérvix, estómago y leucemia mieloide aguda, entre otros) (U.S. Department of Health and Human Services, 2004), por consiguiente, la IARC ha clasificado en el Grupo 1 (carcinogénico) y Grupo 2A (probablemente carcinogénico) al tabaco y sus productos relacionados (IARC, 2012).

De igual forma, los compuestos carcinogénicos contenidos en el humo del tabaco poseen diferente naturaleza química, por mencionar algunos, se pueden encontrar: hidrocarburos aromáticos policíclicos (**HAPs**) (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, por sus siglas en inglés **PAHs**), *N*-nitrosaminas, aminas aromáticas, aldehídos, hidrocarburos orgánicos volátiles y metales, entre otros (Cooke, 2010). De modo que, para su excreción la mayoría de estos carcinógenos requieren de un mecanismo de activación metabólica, que es por lo general catalizado por enzimas del citocromo p450, dando como resultado metabolitos con la capacidad de dañar el material genético, principalmente por la formación de aductos en el DNA, siendo así partícipes del proceso carcinogénico. No obstante, algunos de estos compuestos no requieren un proceso de activación ya que por sí solos pueden dañar



directamente al material genético y condicionar el desarrollo de un proceso neoplásico (U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

Debido a todo lo anterior, el consumo de tabaco es considerado como el mayor factor de riesgo independiente para el desarrollo de neoplasias en el sistema aerodigestivo superior contribuyendo con un 36% de los casos (Hashibe et al., 2009). Así mismo, el riesgo de desarrollar un tumor depende de la cantidad, tipo de tabaco y la frecuencia y/o años de consumo. Particularmente para el desarrollo de CaOF, un meta-análisis desarrollado por Gandini y colaboradores en 2008, estableció que el riesgo para el desarrollo de esta neoplasia es de 6.76 veces respecto a los individuos no fumadores (Gandini et al., 2008). Paralelamente, un estudio realizado en España al comparar 375 casos con diagnóstico de cáncer de CO y/o OF contra 375 controles logró determinar que ser consumidor de tabaco aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en estas regiones en 4.10 veces (Castellsagué et al., 2004). Asimismo, un análisis combinado realizado en 2013 por Wyss y colaboradores haciendo uso de datos epidemiológicos del Consorcio Internacional de Cáncer de Cabeza y Cuello (*International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*, por sus siglas en inglés **INHANCE**) estableció que el consumo de este producto aumenta en 3.46 veces el riesgo de desarrollar alguna neoplasia de HNC, mientras que para el desarrollo CaOF se establece dicho riesgo en 2.31 veces (Wyss et al., 2013).

Otro factor independiente y ampliamente documentado para el desarrollo de CaOF es el consumo de alcohol (Hashim et al., 2019; IARC, 2010), cuya contribución para la incidencia de esta neoplasia es menor, alrededor de un 4% (Hashibe et al., 2009). El etanol actúa como solvente de algunas sustancias carcinogénicas aumentando su permeabilidad, de manera específica para aquellas sustancias que se encuentran presentes en el tabaco (Wight & Ogden, 1998). Reforzando la idea anterior, el tejido no queratinizante que se encuentra revistiendo la mucosa de la cavidad bucal y región orofaríngea facilita el ingreso de dichas sustancias al organismo debido a que cuenta con una mayor permeabilidad (Wertz & Squier, 1991). Otro mecanismo ampliamente descrito por el cual el consumo de alcohol favorece el proceso neoplásico es mediante la generación endógena de acetaldehído (**AA**), acción ejercida por la enzima alcohol deshidrogenasa (**ADH**) (Ogden, 2005); dicho compuesto se encuentra clasificado en el Grupo 1 (carcinogénico) por la IARC (IARC, 2010), posee la capacidad de dañar directamente al DNA mediante la formación de aductos, rompimientos de cadena doble y/o sencilla y entrecruzamientos covalentes (por su término en inglés



“crosslinking”) contribuyendo a la presencia de mutaciones que inician el proceso carcinogénico (Pöschl & Seitz, 2004; Mizumoto et al., 2017).

Se ha documentado que la probabilidad para el desarrollo de CaOF atribuido al consumo de alcohol, en un consumo de 1 – 2 bebidas por día con un contenido neto de etanol de 15.6 mL aumenta el riesgo en 1.03 – 1.26 veces (Hashibe et al., 2007). El consumo de alcohol tiene un comportamiento dosis-dependiente; se ha establecido que el riesgo con un consumo de 25, 50 y 100 gr de etanol por día incrementa el riesgo en 1.75, 2.85 y 6.01 veces respectivamente (Bagnardi et al., 2001).

Aunado a esto, se ha demostrado que ambos factores de riesgo presentan un sinergismo para el desarrollo de esta neoplasia (Boffetta & Hashibe, 2006; Chi et al., 2015), siendo que el consumo de ambos productos con una media de 1 – 2 bebidas y 1 – 10 cigarrillos por día aumenta el riesgo en 4.66 veces, destacablemente, consumidores crónicos (≥ 6 bebidas y ≥ 21 cigarrillos por día) aumentan su riesgo en 50.65 veces (Castellsagué et al., 2004). Esta evidencia se genera la necesidad de la concientización entre la población respecto riesgos a la salud asociados al consumo de estos dos productos con potencial carcinogénico.

Es preciso señalar que, debido a las campañas de concientización a nivel mundial en relación de las repercusiones a la salud sobre el abuso de ambas sustancias, y a pesar de su incidencia anual, algunas neoplasias de HNC han mostrado una importante disminución en su incidencia a nivel mundial. En cambio, el comportamiento de CaOF ha presentado un aumento significativo durante los últimos 20 años alrededor del mundo, donde principalmente países desarrollados han presentado este fenómeno. Este fenómeno se ha atribuido a la infección por el VPH, como uno de los principales actores en esta neoplasia (Chaturvedi et al., 2013). Hecho que, podría ser explicado parcialmente por las características inherentes del tejido presentes en la zona de la OF siendo que las criptas apuntan a ser sitios permisivos para la infección y por ende ser un reservorio para la infección crónica del virus, requisito necesario para el desarrollo del cáncer (Westra, 2012; Doorbar & Griffin, 2019).

Con base a lo anterior, diversos estudios han contribuido a determinar la presencia viral en casos de HNC. Un reflejo de esto es el metaanálisis llevado a cabo en 2014 por Ndiaye y colaboradores demostrando que la positividad a VPH estuvo presente en un 31.54 % de las



12,163 muestras provenientes de diversas regiones del mundo. Respecto al subsitio anatómico, la OF representó un 45.8 %, en contraste, con la CO y laringe que presentaron un 22.1% y 24.2 %, respectivamente. A su vez, el tipo viral con mayor prevalencia fue el VPH16 en un 82.2% de los casos analizados. Se destacó que la prevalencia viral en la OF presenta un comportamiento geográfico, por ello en Asia, Europa, Norte América y Oceanía se presenta en altas proporciones 51.1, 41.4, 60.4 y 47.7 %, respectivamente, mientras que una menor proporción fue encontrada en la región de América Central y Sudamérica siendo representadas por un 14.9% (Ndiaye et al., 2014). Apoyando estos hallazgos, el metaanálisis desarrollado durante 2016 por Castellsagué y colaboradores donde analizaron 3,680 muestras de casos de HNC provenientes de 29 países, se detectó la presencia viral en un 22.74 % de estas muestras. Por otra parte, la estratificación respecto al subsitio logró evidenciar que la OF presentó la más alta proporción de positividad representando un 24.9%, a diferencia de lo observado para CO, hipofaringe y laringe, siendo sus proporciones 7.4%, 3.9% y 5.7%, respectivamente. De igual forma, el tipo viral más prevalente fue el VPH16 en un 75.2% (Castellsagué et al., 2016).

El reconocimiento de los principales factores etiológicos de HNC como la propia distinción entre la orofaringe y la CO ha permitido el establecimiento de dos entidades con marcadas características clínicas y biológicas, de manera que se clasifican en: pacientes **VPH-positivos** y **VPH-negativos**. Por ello, la octava guía para la estadificación de HNC de la "American Joint Committee on Cancer" (**AJCC**), ha generado un sistema propio y único para la estadificación de CaOF (Lydiatt et al., 2017). Algunas de las sustanciales diferencias entre ambas entidades se resumen en la **Tabla 3**, sin embargo, lo destacable es la edad de aparición de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Fakhry et al., 2008; Polanska et al., 2014; Taberna et al., 2017).

Tabla 3. Principales características de las entidades en el diagnóstico de CaOF.

CARACTERÍSTICAS	VPH-POSITIVOS	VPH-NEGATIVOS
<i>Factor de riesgo</i>	Conductas sexuales	Alcohol y tabaco
<i>Edad</i>	Adultos jóvenes	Adultos mayores
<i>Incidencia</i>	Incrementando	Decreciendo
<i>Localización del tumor</i>	Región de la OF (BOT y amígdalas)	Cualquier región (CO y OF)
<i>Histopatología del tumor</i>	No queratinizado	Queratinizado
<i>Diferenciación del tumor</i>	No diferenciado	Cualquiera
<i>Metástasis</i>	Raro	Sí



Estudio de Biomarcadores con Valor Pronóstico en Carcinoma de Orofaringe (CaOF)
y su Relación con el Virus del Papiloma Humano (VPH)



Comorbilidad	No	Sí
Segundos tumores primarios	No	Sí
Respuesta al tratamiento	Favorable (~80%)	Desfavorable (~50%)

De manera puntual, la gran mayoría de los pacientes VPH-positivos se conforman por varones jóvenes, convirtiendo esta situación en un tópico de interés en salud pública debido a que se ve afectada una fracción de la población económicamente activa. Por otra parte, a pesar de que el CaOF se encuentra asociado a un pobre pronóstico presentando una tasa de supervivencia menor al 50% a 5 años, los tumores VPH-positivos exhiben una mejor tasa de respuesta al tratamiento basado en quimioterapia y radioterapia, en comparación a su contraparte (VPH-negativos) (Fakhry et al., 2008; Castellsagué et al., 2016). En vista de que dentro de este subconjunto no todos los tumores presentan el mismo comportamiento, se ha creado la necesidad de proponer nuevos marcadores con valor pronóstico que permitan discriminar pacientes que serán beneficiados con terapia de primera línea.

La quimioterapia, tiene como objetivo medular la citoreducción directamente del tumor primario o en el *foci* metastásico mediante el bloqueo de la proliferación celular o la inducción de muerte celular (Falzone, Salomone, & Libra, 2018). Los agentes quimioterapéuticos utilizados en la actualidad pueden actuar de diversas maneras como: intercalantes en el DNA lo que afecta la función de las topoisomerasas (p. ej. Doxorubicina), promoviendo la polimerización y estabilización de los microtubulos. (p. ej. Paclitaxcel), la formación de entrecruzamientos con el DNA (p. ej. Cisplatino y Carboplatino), inhibiendo la síntesis de la timidilato sintasa (p. ej. 5-fluorouracilo), mimetizando nucleósidos de pirimidina (p. ej. Gemcitabina) o ya sea uniéndose covalentemente al zurco menor del DNA (p. ej. Trabectedina) (Larionova et al., 2019). Respecto a la radioterapia, la radiación ionizante empleada tiene la capacidad de inducir daño a la célula tumoral; directamente al DNA por rompimiento de cadena sencilla (*Single-Strand Breaks*, por su siglas en inglés **SSBs**) o doble (*Double-Strand Breaks*, por su siglas en inglés **DSBs**), provocando entrecruzamientos entre el mismo DNA o bien con proteínas celulares, comprometiendo la integridad de los compartimentos subcelulares como el retículo endoplasmático o la mitocondria, y por último, generando daño de manera indirecta (rompimiento de DNA, peroxidación de lípidos y mal plegamiento proteico) mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, por sus siglas en inglés **ROS**) o de nitrógeno (Reactive Nitrogen Species, por sus siglas en inglés **RNS**) (Kim et al., 2019). En ambos



escenarios terapéuticos, las células tumorales tienen la capacidad de reparar el DNA dependiendo el tipo de daño; en la reparación de DSBs se emplean dos mecanismos: la unión de extremos no homólogos (Non-homologous End Joining, por sus siglas en inglés **NHEJ**) o la recombinación homóloga (Homologous Recombination, por sus siglas en inglés **HR**); respecto a SSBs se repara por excisión de bases (Base excision repair, por sus siglas en inglés **BER**) (Zhou & Parsons, 2020). Todo lo anterior tiene relación con los modelos *in Vitro* en los que se ha puesto de manifiesto que las líneas celulares derivadas de CaOF y positivas al VPH tienen disminuidos los sistemas de reparación DSBs, de manera que la desregulación de dicho mecanismo pudiera estar confiriéndoles cierta susceptibilidad respecto a las terapias (Rieckmann et al., 2013; Sørensen et al., 2014; Nickson et al., 2017).



1.5 Virus del Papiloma Humano

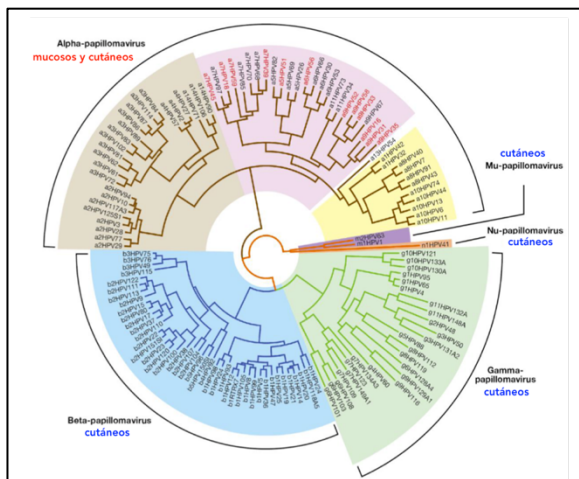


Figura 8. Diversidad de tipos virales que afectan al humano.

El esquema filogenético muestra la relación evolutiva entre los diferentes tipos virales que afectan los nichos epiteliales humanos, se clasifican en 5 importantes géneros: **α** (café claro, tipos virales de bajo riesgo en epitelio cutáneo y amarillo, tipos virales bajo riesgo en epitelio mucoso); **β** (azul), **γ** (verde), **μ** (morado) y **ν** (naranja) géneros que generan infecciones en epitelios cutáneos. Los tipos virales de alto riesgo pertenecen al género **α** (rosa), estos afectan tanto la región anogenital como la aerodigestiva superior, siendo 12 tipos (resaltados con letras rojas) los cuales se ha demostrado su potencial oncogénico (Tomado y modificado de Egawa et al., 2015)

Papillomaviridae es una familia de virus que tienen tropismo por los estratos basales de epitelios cutáneos y de mucosas de una gran variedad de animales (aves, reptiles, marsupiales, entre otros) y humanos (Bravo, de Sanjosé, & Gottschling, 2010). Así que, los Virus del Papiloma humano (VPH) que hasta la fecha han sido secuenciados constan de más de 200 tipos y para su comprensión se han clasificado en 5 géneros: **α** (Alfa), **β** (Beta), **γ** (Gamma), **μ** (Mu) y **ν** (Nu) (Figura 8) (Egawa et al., 2015).

Los tipos virales incluidos en los géneros **β**, **γ**, **μ** y **ν** infectan primordialmente epitelios cutáneos ocasionando la aparición de lesiones benignas proliferativas persistentes (verrugas) plantares; sin embargo, algunos tipos virales del género **β** se han asociado con el desarrollo de cáncer de piel no-melanóticos bajo ciertas condiciones preexistentes como la inmunosupresión y la exposición continua a rayos ultravioleta (UV) (Tommasino, 2017).

Por otra parte, los tipos virales pertenecientes al grupo **α** son de gran importancia médica debido a que su principal vía de transmisión es mediante el contacto sexual logrando infectar tanto la región anogenital como la aerodigestiva superior. Se ha demostrado con evidencia epidemiológica y biológica que ciertos tipos virales tienen potencial para desarrollar neoplasias (Tabla 4) (Martel et al., 2017). Por lo anterior, la IARC ha clasificado en el Grupo 1 (carcinogénico para el ser humano) a 12 tipos virales (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) y se les ha denominado como tipos virales de alto riesgo (VPH-AR), por otra parte, en los Grupo 2A y 2B (probablemente y posiblemente carcinogénico para el ser humano) a los tipos virales: 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 y 82 (Gheit, 2019). Adicionalmente, los tipos virales que tienen un bajo potencial para el desarrollo de neoplasias son conocidos como de bajo riesgo (VPH-BR), en estos se encuentran principalmente el tipo 6 y 11 los



cuáles están asociados al desarrollo de verrugas genitales y casos de papilomatosis respiratoria recurrente (**PRR**) (de Sanjosé, Brotons, & Pavón, 2018).

En relación a los VPH-AR, llevan a término su ciclo viral mediante la infección de epitelios escamosos estratificados, sin embargo, los sitios colindantes de estos tejidos, comúnmente conocidos como "zona de transformación", constan de epitelio columnar carente de dicho arreglo y generalmente son sitios propensos para la infección pero también susceptibles al desarrollo de neoplasias siendo esto resultado de un ciclo abortivo o también conocido como no productivo (Mirkovic et al., 2015).

Tabla 4. Neoplasias causadas por el VPH.

SITIO DEL CÁNCER	CASOS	ATRIBUIDOS AL VPH	FRACCIÓN ATRIBUIBLE	HOMBRES	MUJERES
<i>Cuello uterino</i>	528 000	530 000	100 %	–	528 000
<i>Ano</i>	40 000	35 000	88 %	17 000	18 000
<i>Vagina/vulva</i>	49 000	20 500	41 %	–	20 000
<i>Pene</i>	26 000	13 000	51 %	13 000	–
<i>Orofaringe</i>	96 000	29 000	31 %	24 000	6 000
<i>Cavidad oral/laringe</i>	358 000	9 000	2.4 %	7 000	2 000

Respecto a su estructura, los VPH son virus no envueltos de forma icosaédrica de tamaño aproximado entre 50 – 60 nm, su genoma consiste en una molécula de DNA de doble cadena (*Double-stranded DNA*, por sus siglas en inglés **dsDNA**) presente en forma episomal (circular) de aproximadamente 7,500 a 8,000 pb. Dicho material se encuentra contenido en una cápside constituida por 360 monómeros de la proteína mayor (**L1**) arreglados en unidades pentaméricas llamadas capsómeros; aunado a esto, al centro de cada capsómero reside la proteína menor (**L2**) teniendo una interacción directa con el DNA viral, cabe destacar que ambas proteínas son fundamentales en el proceso de entrada e infección de las células del huésped (**Figura 9a**) (Gheit, 2019).

A pesar de la diversidad respecto a su biología y los padecimientos asociados entre los diferentes tipos virales se comparte un arreglo similar en cuanto a su genoma, por lo que para su mejor entendimiento se ha sido dividido en 3 regiones: 1) *la región larga de control* (por sus siglas en inglés **LCR**), en ella se encuentra el inicio de la replicación donde existen sitios para la unión de factores de transcripción y regiones que regulan la expresión génica viral; 2) *la región temprana* que codifica para seis genes (**E1 – E6**), cuyos productos están involucrados en múltiples funciones como la replicación viral, la regulación de la expresión



génica del mismo virus, la evasión del sistema inmune, activación de señales mitógenas, entre otros procesos; y por último 3) *la región tardía*, que contiene los genes que codifican para las proteínas estructurales (**L1 – L2**) que serán fundamentales en la culminación del ciclo viral productivo y la generación de nuevos viriones (**Figura 9b**) (Sano & Oridate, 2016;

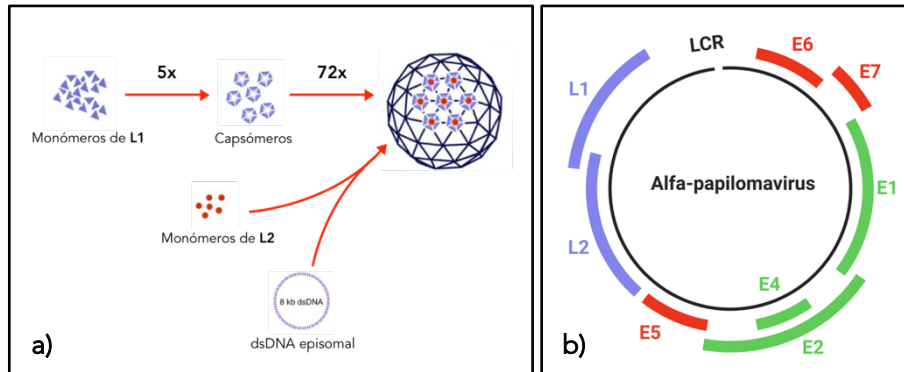


Figura 9. Estructura y arreglo genómico del VPH.

a) La proteína mayor L1, se organiza en pentámeros que darán lugar a la formación de 72 capsómeros que permitirán el ensamblaje final de la cápside viral. Al centro de los capsómeros se sitúa la proteína menor L2 que se asocia a la molécula de DNA. b) Esquema del genoma viral (Alfa-papilomavirus), cada región es importante en la etapa productiva del virus, la cuál va en sincronía con el programa de diferenciación de la célula infectada. La denominación en inglés de "Early" y "Late" hacen referencia a la fase de expresión temprana y tardía, respectivamente. Asimismo, esta expresión está regulada por promotores tempranos y tardíos, y por procesos de *splicing* alternativo. Las regiones resaltadas en rojo indican los genes con potencial oncogénico.

(Doorbar et al., 2020).

1.5.1 El Ciclo Viral

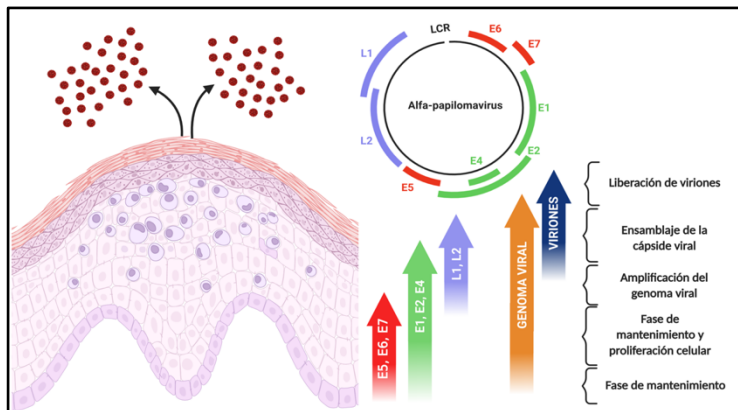


Figura 10. Esquemización del ciclo viral en un epitelio escamoso estratificado.

Este proceso está altamente coordinado y en él se ven involucradas todas las proteínas que codifica el genoma del VPH. Dicha participación va acorde al programa de diferenciación del queratinocito infectado y como principal objetivo es propiciar el ambiente adecuado para la formación de nuevas partículas virales. (Tomado y modificado de Doorbar et al., 2020)

Se define como un exitoso ciclo productivo al proceso que resulta en la síntesis de nuevos viriones que se liberan en capas superficiales del epitelio estratificado infectado a causa del secuestro del programa de diferenciación y la acción conjunta de las proteínas virales (**Figura 10**). De modo que para lograr esto es

necesario que el VPH logre acceder a los estratos basales mediante un daño o una micro lesión (Egawa et al., 2015). El reconocimiento entre L1 y los proteoglicanos de heparán



sulfato presentes en la matriz extracelular o en la superficie de las células basales ha sido descrita como el primer paso para dicho proceso. Posteriormente, esta interacción induce un cambio conformacional de la cápside lo que permite exponer a la proteína menor L2, la cual será escindida en su porción amino terminal por una enzima celular con actividad de proteasa (furina); seguido a esto, se dará una nueva interacción con un segundo receptor que permitirá la endocitosis mediada por vesículas de distintos componentes proteicos (Bugnon Valdano, Pim, & Banks, 2019).

Para dar inicio a la fase de mantenimiento, el VPH logra residir en los núcleos de células no diferenciadas donde conserva su genoma episomal en un bajo número copias (aproximadamente de 50 – 100 copias por célula) garantizando distribuir su genoma en cada evento de división celular, y dar inicio a la expresión de genes tempranos y paralelamente evadir al sistema inmune que eventualmente favorecerá la persistencia durante meses o años (Doorbar et al., 2012).

Debido a que el virus no expresa los factores necesarios para el proceso de replicación, la acción simultánea de las proteínas E1 y E2 es sumamente importante para el secuestro de la maquinaria celular, tanto DNA polimerasas como factores asociados esenciales (Harden & Munger, 2017). De modo que, E2 logra reconocer secuencias específicas sobre la LCR dando paso al reclutamiento y unión de E1, necesaria para la formación de un heterodímero entre ambas proteínas que le confieren una mayor afinidad y estabilidad. La única proteína viral con actividad enzimática es E1, cuya función de helicasa resulta importante para el reconocimiento del sitio de inicio de la replicación, específicamente en zonas ricas en AT. Por otra parte, se ha descrito que E2 actúa como iniciador de la replicación viral, además de ser represor transcripcional de las proteínas E6 y E7 del proceso de transformación celular (McBride, 2013; de Sanjosé et al., 2018).

Normalmente en los epitelios las células que continúan con su programa de diferenciación son desplazadas del estrato basal y pierden la capacidad de dividirse. De ahí que, en orden para que el VPH inicie su etapa productiva ha desarrollado estrategias que obligan a la célula infectada reingresar al ciclo celular, particularmente en la fase S (Harden & Munger, 2017). La proteína E7 tiene la capacidad de interactuar con la proteína pRb, gen supresor de tumores cuya principal función es regular la proliferación previniendo la entrada no programada a la fase S del ciclo celular (Thomas & Balan, 2012). Una manera de promover el ingreso al ciclo celular es mediante la formación del dímero E7/pRb lo que provoca la



liberación del factor transcripcional E2F, de este modo se dará inicio a la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA y proliferación celular (Münger & Howley, 2002).

De igual importancia en el ciclo viral, es la acción de la proteína E6 permite prevenir la muerte prematura de la célula infectada. E6 tiene la habilidad de interactuar con diversas proteínas celulares, entre ellas una ubiquitina ligasa E3, proteína asociada a E6 (E6AP), donde su función es marcar a las proteínas con ubiquitina para ser degradadas vía proteosoma (Scheffner et al., 1993). Para prevenir el proceso apoptótico, el VPH tiene como blanco a p53, gen supresor de tumores, que su principal función es salvaguardar la integridad del DNA evitando la proliferación de células con daño en el material genético o induciéndola a la muerte celular (Zilfou & Lowe, 2009). La interacción de E6/E6AP induce un cambio conformacional permitiendo que E6 logre interactuar con p53 y posteriormente degradarlo con el mecanismo previamente mencionado (Martinez-Zapien et al., 2016).

Dentro del ciclo viral es destacable la participación de la proteína E5 la cual tiene la capacidad de interactuar con elementos de la bomba de protones del endosoma, permitiendo incrementar el pH del mismo y así evitar la degradación del receptor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, por sus siglas en inglés **EGFR**) dando paso a su reciclaje contribuyendo con la actividad mitógena (Straight, Herman, & McCance, 1995). Por otra parte, E5 cuenta con dominios transmembranales lo que le permite residir en el aparato de Golgi. Se ha demostrado que participa en la retención del complejo mayor de histocompatibilidad clase I evitando su exportación a la superficie celular. De esta manera, E5 contribuye a la evasión del sistema inmune lo que al mismo tiempo favorece la persistencia viral (Ashrafi et al., 2005).

Durante los diferentes estratos del epitelio se da la acción específica de las proteínas virales todo en función de completar el ciclo viral; no obstante, en las capas intermedias del epitelio estos procesos toman mayor fuerza, un ejemplo de ello es el número de copias del genoma que en el estrato basal permanece alrededor de 100 copias por célula; sin embargo, se ha demostrado que logra ascender hasta 10,000 copias por célula en las capas superficiales (Maglennon, McIntosh, & Doorbar, 2011). Otro aspecto importante es la participación de la proteína E4, la cual se ve involucrada en la restructuración de los filamentos de citoqueratina lo que conlleva a que las células faciliten la liberación de los viriones (Doorbar et al., 2015). Uno de los patrones característicos de la acción de E4 son los "coilocitos", células que



cuentan con la formación de un halo perinuclear y un núcleo picnótico resultando ser así un signo patognomónico de la infección por VPH (Araldi et al., 2018).

La razón de que culmine el ciclo viral se debe a la expresión de los genes tardíos que codifican para las proteínas L1 y L2, su principal función radica en el proceso de empaquetamiento viral que ocurre en el núcleo celular (Buck et al., 2013; Wang & Roden, 2013). Necesariamente en la capa superficial del epitelio escamoso diferenciado predomina un ambiente oxidante, esto permite la formación de enlaces disulfuro entre los monómeros de L1 y que tiene como efecto la maduración de la cápside impactando en su estabilidad y resistencia viral (Buck et al., 2005). Finalmente, el VPH no requiere de un proceso lítico, para ello la liberación de las nuevas partículas virales depende exclusivamente de la pérdida de la integridad nuclear y citoplasmática del proceso de diferenciación del queratinocito infectado (Doorbar et al., 1991).

1.5.2 Mecanismo Oncogénico del VPH

Los patrones ordenados de la expresión génica que subyacen de una infección productiva difieren de los que se dan en un evento neoplásico, concretamente en una infección no productiva. De modo que, la acción conjunta de sus proteínas con potencial oncogénico (E5, E6 y E7) tienen la capacidad de alterar numerosos procesos celulares importantes brindando una ventaja a las células infectadas para dar paso a la proliferación celular descontrolada con la posibilidad de desarrollar un fenotipo maligno (Harden & Munger, 2017; Doorbar et al., 2020).

Un evento crucial para la inducción de la carcinogénesis es la integración del genoma viral de los tipos virales AR dentro del genoma celular, evento que ocurre especialmente en las lesiones persistentes y consideradas como pre-malignas (Schiffman et al., 2016). Esto tiene como consecuencia la interrupción del marco de lectura del gen que codifica para E2 lo que impacta en la regulación negativa de la expresión de los genes codificantes para E6 y E7, resultando en su expresión aberrante (Moody & Laimins, 2010).



2. ANTECEDENTES

La evaluación de la presencia viral y algunos otros marcadores han sido estudiados con el fin de predecir el desenlace clínico de pacientes con CaOF, inclusive son una herramienta para analizar la heterogeneidad entre ellos, aunado a esto se han evaluado proteínas implicadas en la resistencia al tratamiento.

Kumar y colaboradores en 2008 evaluaron la presencia de DNA viral y la expresión de las proteínas p16, p53, Bcl-xL y EGFR en 50 muestras provenientes de casos con diagnóstico de CaOF, el 76% fue representado por el sexo masculino. Los biomarcadores candidatos se utilizaron para buscar una asociación de la respuesta al tratamiento y el tiempo de supervivencia global (SG) con respecto a una infección por VPH. Se concluyó que el empleo individual de p16, DNA viral y EGFR lograban predecir la SG, pero al evaluarse de manera conjunta lograron discriminar pacientes con mejor y peor pronóstico. El análisis conjunto de p53 y Bcl-xL discriminó tumores de mala respuesta al tratamiento (Kumar et al., 2008).

En Alemania, Holzinger y colaboradores en 2012, analizaron 199 casos con diagnóstico de CaOF, donde se propuso utilizar como marcadores el DNA viral, la carga viral, el RNAm de E6/E7 y el marcador subrogado de la infección por VPH, p16. El 74 % de los casos de esta cohorte fueron hombres y 43 % de las lesiones se presentaron en las amígdalas. Respecto a los marcadores moleculares, estos obtuvieron un mejor valor predictor en contraste a la evaluación única y aislada de p16; sin embargo, el análisis en conjunto de todos estos marcadores proporcionó una mejoría respecto al tiempo de SG de los pacientes (Holzinger et al., 2012).

Continuando con la evaluación de otros biomarcadores, en 2012, Liang y colaboradores evaluaron 722 casos diagnosticados en Boston durante un periodo de 1999 a 2003, emplearon biopsias con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello y determinaron la presencia de DNA viral y la expresión de p16; aunado a esto, se colectaron muestras de sangre de algunos participantes para la detección serológica de las proteínas E6, E7 y L1. El 40.77% de las biopsias fue representado por neoplasias malignas de la zona de la orofaringe. Los autores concluyeron que la evaluación aislada de p16 o DNA viral no confieren una mejora en el tiempo respecto a la SG, de manera que al incorporar datos de la expresión de proteínas virales se mejoró la predicción. Se concluyó la clara importancia en la combinación de la presencia de DNA viral y la seropositividad de las proteínas virales, representan una herramienta de utilidad clínica (C. Liang et al., 2012).



El grupo de Golusiński en 2017 de una cohorte multicéntrica en Polonia conformada por 382 sujetos diagnosticados con CaOF en un periodo comprendido de 2004 a 2012; se propuso determinar la expresión de p16 como un marcador alternativo de la infección por VPH y su asociación con la SG. El 68.9% de los casos pertenecían a las amígdalas palatinas, por otra parte, la mayor proporción de casos de CaOF se observó en pacientes del sexo masculino el cual representó un 78.8 %. Como resultado, se evidenció una diferencia significativa en el grupo que presentaron una tinción positiva para p16 viéndose reflejado en un aumento de la SG, en cambio, se logró estimar que casos negativos a la tinción tienen 3.44 veces el riesgo de morir por el padecimiento. Los autores destacan la utilidad de evaluar a p16 mediante la técnica de inmunohistoquímica debido a que es asequible, sencilla y reproducible, no obstante, se reconoció que este modelo de diagnóstico debe ser complementado mediante otras herramientas moleculares debido a la baja proporción de VPH negativos y p16 positivos (Golusiński et al., 2017).

Los trabajos antes mencionados permiten evidenciar la asociación entre la infección por VPH y una mejora en la SG de los pacientes con CaOF, mediante el empleo de distintos biomarcadores, pero hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual se mejora la respuesta. Por otra parte, es de gran interés determinar proteínas que estén asociadas a la respuesta al tratamiento o involucradas en el proceso carcinogénico de distintos tipos de cáncer, todo esto y con el fin de personalizar tratamientos o posiblemente establecer nuevos blancos terapéuticos.

Un ejemplo es β -Catenina, proteína implicada en la vía de señalización Wnt/ β -Catenina, donde actúa como co-activador en diversos procesos celulares como embriogénesis, proliferación, regeneración y adhesión celular mediada por interacción con la proteína cadherina. Su desregulación se ha asociado con la capacidad de invasión de las células tumorales, promoción de la proliferación celular y capacidad de renovación de células pluripotentes (Lee et al., 2014; Mantilla, Mellado, Jaramillo, & Navas, 2015; Ma et al., 2018). La sobreexpresión de β -Catenina en núcleo y citoplasma mediante inmunohistoquímica en cánceres de cabeza y cuello se asoció con estadios clínicos avanzados, tamaño del tumor e invasión a ganglios cercanos (Shang et al., 2017).

Otra proteína evaluada en procesos neoplásicos es Claudina 4, tiene un papel importante en la zona de oclusión e interacción célula-célula, se caracteriza por estar presente en la membrana y tiene la capacidad de interactuar con células que expresen la misma proteína



(Neesse, Griesmann, Gress, & Michl, 2012). Debido a su expresión en epitelio se ha sugerido emplearse como un marcador de diferenciación (Hicks et al., 2016). Se documentó que Claudina 4 está asociada a un comportamiento agresivo de tumores en ovario; aunado a esto, esta proteína se relaciona con resistencia a quimioterapia en este tipo de cáncer (Hegab et al., 2015). Por otra parte, en cáncer de estómago, la baja expresión de Claudina 4 se relaciona con la invasión de tejido linfático (Jung, Jun, Jung, Chin, & Park, 2011).

Caveolina 1 es una proteína integral de membrana que se expresa abundantemente en distintos tipos celulares como lo son: células adiposas, células endoteliales, fibroblastos y células musculares, entre otras (Fu et al., 2017). Esta proteína compone la mayor parte de las caveolas, las cuales son micro-dominios especializados de la membrana plasmática que participan en la señalización y transporte celular (Ketteler & Klein, 2018). Caveolina 1 se ha asociado en procesos de transformación celular, crecimiento tumoral, migración celular, muerte celular, angiogénesis y resistencia terapéutica (Gerstenberger et al., 2018; Y. Liang et al., 2018).

Por otra lado, el DNA es susceptible al daño provocado por las especies reactivas de oxígeno, una de las moléculas principales derivadas de esta acción es la 8-oxoguanina (8-OHG); esta base modificada propicia apareamientos erróneos en el genoma provocando transversiones, sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa (Kudryavtseva et al., 2016; Poprac et al., 2017). La presencia de 8-OHG se emplea como marcador de daño al DNA y se ha propuesto como un marcador pronóstico y/o predictor en cáncer; por ejemplo, en cáncer de esófago se evaluó como indicador pronóstico permitiendo clasificar a sujetos de diagnóstico clínico desfavorable (He, Zhao, Wang, Zhang, & Wang, 2014), además, la detección de esta molécula en orina tiene potencial predictor en sujetos que pudiesen desarrollar cáncer de vejiga o próstata (Chiou et al., 2003). También se ha demostrado que la 8-oxo-dG puede utilizarse como potencial marcador en el desenlace clínico y respuesta a la terapia en tumores gastrointestinales superiores (Pour Khavari, Liu, He, Skog, & Haghdoost, 2018).

Las proteínas anteriormente mencionadas representan candidatos para ser evaluados en casos de CaOF y determinar su asociación con el VPH; conocer su implicación en el pronóstico y respuesta al tratamiento con la finalidad de ser propuestos como biomarcadores en este tipo de padecimiento.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaOF ha incrementado su incidencia en los últimos años, donde casos positivos al Virus del Papiloma humano se presentan en edades tempranas representando un tópico de interés en salud pública. Los casos VPH-positivos exhiben una mejor supervivencia global (SG); sin embargo, la evaluación aislada de dicho marcador no es suficiente para predecir el pronóstico clínico del paciente existiendo a la fecha estudios controversiales. Así mismo el VPH es capaz de modificar la función y expresión de diversas proteínas celulares, lo que podría explicar el comportamiento de esta entidad en términos de SG y respuesta a tratamiento estimada por la supervivencia libre de enfermedad (SLE).

4. JUSTIFICACIÓN

El propósito de estudiar biomarcadores de valor pronóstico contribuirá a identificar pacientes con CaOF que presenten características moleculares que permitan estimar una mayor SG, con el fin de conducir a una terapia personalizada más efectiva. Así mismo, la identificación de pacientes que responderán al tratamiento de acuerdo con las características del tumor será una herramienta de gran utilidad clínica, lo que además alentará a probar nuevos esquemas de tratamiento que logren ser más efectivos para cada paciente al identificar proteínas que estén implicadas en la resistencia de estos. Por lo que, es de gran interés evaluar si la expresión de un panel de proteínas podría actuar como factor pronóstico en CaOF.

5. HIPÓTESIS

El CaOF exhibe un patrón de proteínas asociadas a supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) que está relacionada a la presencia del VPH.



6. OBJETIVOS

6.1 General

Identificar biomarcadores de supervivencia global (SG) y respuesta a tratamiento (SLE) en CaOF y su asociación con el VPH.

6.2 Particulares

1. Generar una base de datos de con casos de CaOF atendidos en el INCan de 2005 a 2017.
2. Determinar la presencia y el tipo de VPH en casos de CaOF.
3. Implementar una técnica de detección múltiple para las proteínas candidatas basada en fluorescencia.
4. Determinar la expresión de proteínas candidatas en casos de CaOF.
5. Validar la expresión de proteínas candidatas mediante una técnica diferente.
6. Relacionar la supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) con la presencia del VPH y la expresión de las proteínas candidatas en CaOF.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del Estudio

Estudio retrolectivo longitudinal, la presente cohorte incluyó casos con diagnóstico de CaOF.

7.2 Población de Estudio

Muestreo a conveniencia empleando el registro de casos con diagnóstico de CaOF que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), ubicado en la zona sur de la Ciudad de México en Av. San Fernando No. 22, Alcaldía de Tlalpan, durante el período comprendido de 2005 – 2017.

7.3 Lugar de Estudio

Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos y el Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer pertenecientes a la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.



7.4 Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Casos con diagnóstico histológico de CaOF
- Casos vírgenes al tratamiento
- Casos con tratamiento básico completo, asimismo, que dicho esquema haya sido administrado con fines curativos
- Historia clínica completa

Criterios de Exclusión

- Sin existencia del bloque de parafina
- Casos con evidencia de metástasis

Criterios de Eliminación

- Muestras con material y calidad insuficiente
- Presencia de tejido necrótico

7.5 Financiamiento y Aprobación

Este proyecto fue parcialmente financiado por el Instituto Nacional de Cancerología Ref: (015/039/IBI)(CEI/998/15), como también por el CONACyT Ref: FOSIS-261499, así como también, por el "PRONAI-7-VIRUS Y CÁNCER" Ref: 303044; de igual forma, se contó con la aprobación de los Comités Científico y de Ética Institucionales, referencias (015/039/IBI) y (CEI/998/15) cuya documentación se encuentra en el Anexo 1.

7.6 Descripción Metodológica General del Estudio

7.6.1 Generación de una base de datos con casos de CaOF

Se llevó a cabo mediante la recolección de la información de 151 expedientes médicos electrónicos (INCAnet) pertenecientes a casos con un diagnóstico de CaOF en un período comprendido de 2005 a 2017. Posteriormente, se conformó una base de datos con la información proveniente de estos registros electrónicos empleando el paquete estadístico SPSS® Versión 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY). En el compendio electrónico se consideraron y analizaron diversas variables clínico-patológicas, siendo enlistadas a continuación: *edad, sexo, antecedentes de consumo de alcohol y tabaco, grado de escolaridad, comorbilidades, fecha de diagnóstico, histología tumoral, estadio clínico, esquema de tratamiento de primera línea, fecha de inicio y conclusión de este, tipo y fecha de respuesta y, por último, fecha de recurrencia.*



Fueron registrados los siguientes datos: *presencia del VPH, tipo viral*, de la misma manera, y el registro de las *cuantificaciones de las intensidades proteicas* para las dos metodologías propuestas: Inmunofluorescencia indirecta (**IFI**) e Inmunohistoquímica (**IHQ**).

Se solicitaron al Servicio de Anatomía Patológica los bloques de parafina con los tejidos de las lesiones en estudio, para realizar cortes histológicos necesarios en las diferentes metodologías propuestas en el proyecto, los cortes histológicos fueron teñidos con H&E y revisados por la Dra. Belem Gabiño López del Laboratorio de Histología y Microscopía (LHIM) del INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica). Por cada caso se realizaron cortes consecutivos de 2 μm de espesor que fueron montados en laminillas electrocargadas, por lo que este material fue destinado para las tinciones de IFI e IHQ. Se solicitaron cortes de 10 μm de los bloques de parafina, los cuales fueron contenidos de manera individual en tubos Eppendorf® de 2 mL, para el proceso de extracción de DNA y la posterior detección viral.

7.6.2 Determinación de la presencia y el tipo de VPH en muestras de pacientes con CaOF

Como primera instancia, se llevó a cabo la extracción de DNA a partir de los cortes de 10 μm , empleando el kit "QIAamp® DNA Mini Kit" (QIAGEN), bajo la siguiente metodología: A cada corte contenido en su respectivo Eppendorf® se le añadieron 1,200 μl de xilol y se agitó vigorosamente empleando el vórtex, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos a TA (temperatura ambiente), finalizando este proceso se retiró el sobrenadante mediante pipeteo evitando el desprendimiento del sedimento. Posteriormente, al sedimento se le agregaron 1,200 μl de etanol con la finalidad de remover el xilol residual, para ello se agitó vigorosamente usando un vórtex y después se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad a TA, dicho procedimiento se repitió 2 veces. Enseguida, cuidadosamente se removió el etanol excedente por pipeteo evitando tocar el sedimento para después incubarse con la tapa abierta durante 15 minutos a 37°C, para evaporar el etanol residual. Inmediatamente, se resuspendió el sedimento con 180 μl del buffer **ATL** y se le agregaron 20 μl de proteinasa K, dicha suspensión se agitó con vórtex y se incubó a 56°C hasta que el tejido quedó completamente lisado (aproximadamente 3 horas).

Pasado este tiempo, se adicionaron 200 μl de buffer **AL** y se agitó en vórtex alrededor de 15 segundos, luego se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, se incubó a



70°C durante 10 minutos y se repitió la centrifugación a 14,000 rpm por 1 minuto. Enseguida, se le adicionaron 200 µl de etanol y se agitó con vórtex por 15 segundos, de la misma forma se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto. Esta mezcla se dispensó en una columna de intercambio iónico (provista en el kit) y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. Enseguida, la columna se colocó en un tubo colector nuevo y se le agregaron 500 µl del buffer **AW1**, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Consecutivamente, se adicionaron 500 µl del buffer **AW2** y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Dicha columna se traspasó a un Eppendorf nuevo donde se le añadieron 100 µl de agua inyectable estéril y se incubó a TA alrededor de 5 minutos con la finalidad de eluir el DNA.

Finalmente, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto y se realizó una segunda elución con 50 µl de agua inyectable, realizando el mismo procedimiento. El DNA extraído de cada muestra se cuantificó para determinar el grado de pureza empleando el Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

Tabla 5. Protocolos de amplificación por iniciador.

PRUEBA	GEN AMPLIFICADO	SECUENCIA (5' → 3')	DIRECCIÓN	PRODUCTO
<i>Integridad del DNA</i>	β -Globina	GH20 GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	Fwd	286 pb
		PC04C AACTTCATCAACGTTCCACC	Rev	
<i>Detección viral</i>	L1	MY09 CGTCCMARRGGAWACTGATC	Fwd	450 pb
		MY11 GCMCAAGGGWCATAAYAATGG	Rev	

Con la finalidad de evaluar la integridad del DNA extraído a todas las muestras se les sometió a la amplificación de un fragmento de β -globina, posteriormente y como primera aproximación para la detección de la presencia viral, se sometieron a la amplificación del gen que codifica para la proteína L1 la cual forma parte de la cápside viral (Fuessel Haws et al., 2004) mediante los primers universales MY 09/11 (**Tabla 5**). Por otra parte, como control positivo se utilizó el DNA de células HeLa y SiHa, el control negativo con mezclas sin DNA. Las condiciones de PCR se resumen en la **Tabla 6** para cada acción o tratamiento realizada.



Tabla 6. Protocolos de amplificación por iniciador.

INICIADORES	DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	EXTENSIÓN	CICLOS	CONDICIONES
GH20 PC04C	94°C – 50 ''	55°C – 50 ''	72°C – 55 ''	38	2 mM de Mg ²⁺ , 100µM dNTPs, 1.25 U de enzima a un volumen final de 20 µL
MY09 MY11	94°C – 50 ''	55°C – 50 ''	72°C – 55 ''	38	

En la tipificación viral se empleó el kit comercial de detección múltiple "MPCR Kit For Human Papilloma Virus Set 2" (Cat. MP-70215 Maxim Biotech, Inc®). Esta metodología tiene la capacidad de amplificar de manera simultánea el gen codificante para la proteína E6 de 8 genotipos virales (AR: 16, 18, 31, 33, 52 y 58; BR: 6 y 11). Para ello se siguieron las indicaciones que dicta la casa comercial (Tabla 7).

Tabla 7. Protocolos de amplificación para el kit "MPCR Kit For Human Papilloma Virus Set 2".

INICIADOR	DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	EXTENSIÓN	CICLOS	CONDICIONES
E6	96°C – 1'	68-79°C – 1'	70°C – 10'	38	12.5 µL MPCR Buffer Mixture, 2.5 µL Primers MPCR, 0.5 µL Enzima (Taq DNA Pol), muestra de DNA a una [] de 50 ng/mL y agua estéril todo llevado a un volumen final de 25 µL



7.6.3 Estandarización de la técnica de detección múltiple para las proteínas candidatas mediante inmunofluorescencia indirecta

La IF es una técnica utilizada para detectar localización y la abundancia de una gran variedad de antígenos en diferentes tipos de tejidos o preparaciones celulares. Se fundamenta en la interacción antígeno-anticuerpo, aunado a ello, el anticuerpo se encuentra conjugado a un fluoróforo (anticuerpo primario) (Parra-Medina & Polo, 2017). Una variante de dicha herramienta es la inmunofluorescencia indirecta (**IFI**), en ella solo los anticuerpos secundarios, los cuales reconocen al anticuerpo primario, se encuentran conjugados al compuesto fluorescente y al ser expuestos a energía luminosa en una longitud de onda adecuada emiten fluorescencia dando paso a su detección y su posterior cuantificación (Im et al., 2019). Como primera aproximación a la técnica, se llevó a cabo la estandarización de la fluorescencia múltiple mediante la tinción a células HaCaT con los diversos anticuerpos primarios para distintas proteínas.

Para el procesamiento de IFI, los cortes histológicos de 2 μm fueron sometidos a un proceso de desparafinación durante toda la noche en estufa de calor seco a 70 – 80°C. Seguido a esto, se les aplicó un ciclo extra de desparafinación dejando reposar en xilol caliente (~70°C) durante 30'. A continuación, se realizaron lavados consecutivos con diferentes soluciones, primero se utilizó xilol (dos veces por 15'), luego etanol (2 veces etanol al 96% durante 5', 1 vez en etanol al 70% por 4' y 1 vez en etanol al 50% durante 1'). En el proceso de hidratación se empleó agua destilada dos veces por 4', ya finalmente fueron sumergidas en PBS hasta su procesamiento. La recuperación de antígenos se llevó a cabo utilizando una solución de citratos (Kit-BSB 0023 BioSB®) mediante el uso de presión y temperatura con la finalidad de restaurar la estructura molecular del antígeno y recuperar la inmunoreactividad. Seguido a su enfriamiento, los tejidos fueron aislados empleado un Mini PAP Pen (Cat-008877 Invitrogen®). Posteriormente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena (Solución del Kit- BSB 0007 BioSB®) durante 1 hora, y se cubrieron todos los tejidos con una solución de NH_4Cl al 0.054M con la finalidad de reducir la autofluorescencia inherente del tejido (Gandhi & Khare, 2017). Consecutivamente, el tejido se permeabilizó con una solución de PBS-Tween20 al 0.08% para facilitar la reacción antígeno-anticuerpo, además, para el bloqueo antígeno inespecífico se empleó BSA al 1%. Para concluir el primer día, se reconstituyó el anticuerpo primario en medio **IFF** y se aplicó en los tejidos durante toda la noche a 4°C.



Al siguiente día, se realizaron dos lavados PBS-Tween20 al 0.08% durante 5', para retirar el excedente de anticuerpo. Después, se adicionaron los anticuerpos secundarios (igualmente reconstituidos en medio IFF) durante 30' a TA y luego durante 15' a 37°C, estas dos incubaciones se realizaron en oscuridad para evitar la degradación del fluoróforo. Posteriormente, se repitió el lavado de las laminillas con PBS-Tween20 al 0.08% durante 5' (x2 veces). Por último, se realizó el montaje de las laminillas con medio Vectashield (Cat. H-1200 Vector Laboratories®), este reactivo contiene 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), compuesto con alta afinidad por el DNA de modo que se intercala y facilita la localización de los núcleos celulares.

Posteriormente, los tejidos previamente montados se examinaron haciendo uso del sistema de adquisición de imágenes EVOS FL (Cat. AMF4300 Thermo Fisher Scientific®). Su fundamento de operación está basado en epifluorescencia, permitiendo el análisis de 4 canales simultáneos, lo que facilita el estudio de diversos marcadores en una sola laminilla. Estos sistemas se caracterizan porque inciden energía a partir de su fuente de luz LED impactando directamente en la muestra, eventualmente, excitando al fluoróforo en su determinada longitud de onda, dicho compuesto emite fluorescencia en una longitud de onda diferente a la primera. Ambas energías, excitación y emisión, pasan por un filtro dicróico donde se discriminan para posteriormente ser captados por su software, ya que la energía es transformada a pixeles recreando la imagen del tejido en cuestión (Figura 11) (Masedunskas et al., 2013).

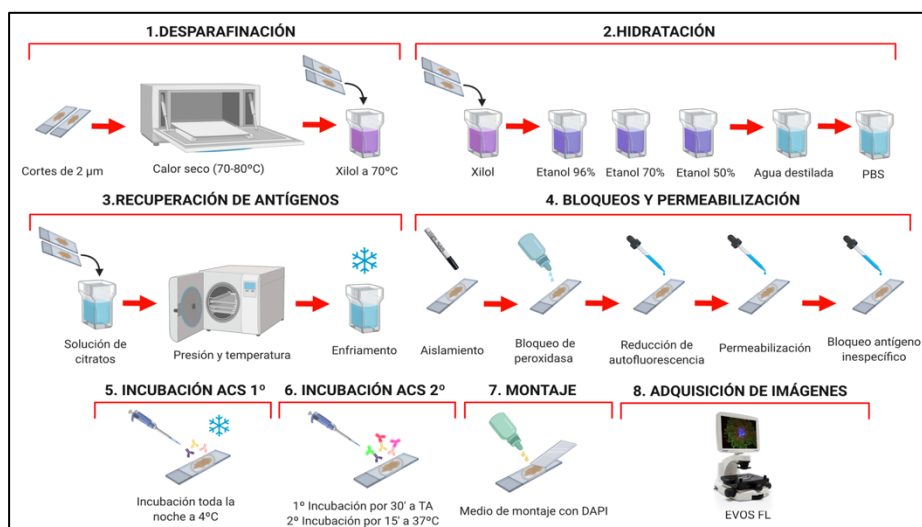


Figura 11. Diagrama general del procedimiento de IFI.



El formato de salida de la captura de las laminillas fue de tipo **RGB**, particularmente, estas imágenes se componen por la combinación de 3 colores básicos (**red, green & blue**) los cuales están asociados al color de emisión de cada fluoróforo empleado. Para su análisis, cada imagen se transformó a un formato de 8-bits permitiendo cuantificar la intensidad de los marcadores mediante densidad de los pixeles en una escala de 0 (negro) a 255 (blanco). Después, se llevó a cabo dicha cuantificación empleando el software Fiji-ImageJ (Schindelin et al., 2012) y siguiendo el protocolo propuesto por la Universidad de Queensland, Australia (Figura 12) (<https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>). Obtenidas las cuantificaciones, las medianas de cada marcador se utilizaron como punto de corte para asignar sus intensidades (expresión: alta o baja) (Pelekanou et al., 2018).

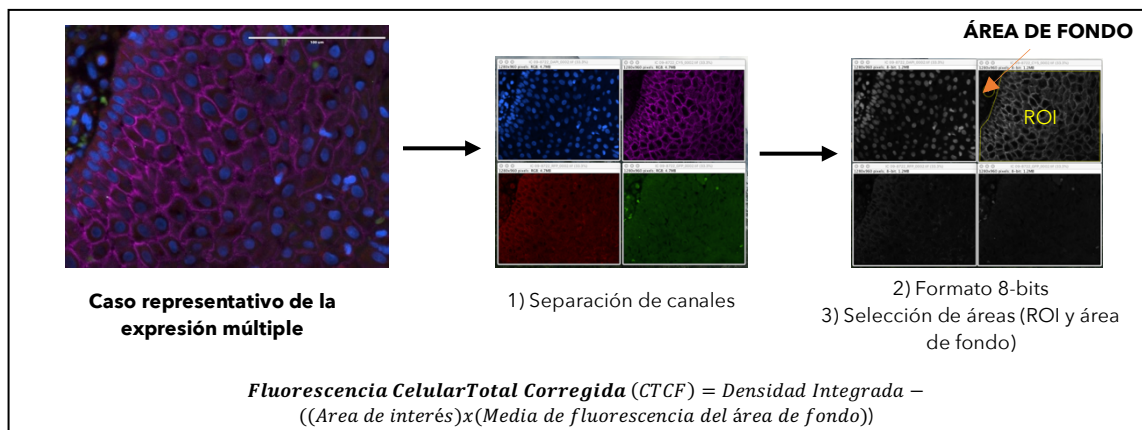


Figura 12. Diagrama de trabajo para la cuantificación de las intensidades de IFI.

La imagen digitalizada por caso debe separarse en los canales que la componen (canal por longitud de onda, RGB), posteriormente, dichos canales son transformados a un formato de 8-bits (escala de grises 0 – 255). A continuación, se deben delimitar 2 áreas para llevar a cabo la fórmula de fluorescencia total corregida (CTCF), 1) *área/región de interés (ROI)* y 2) *área de fondo*. Por último, los datos arrojados por el software permiten el cálculo matemático.
Magnificación de las imágenes 40X.

7.6.4 Validación de la expresión de proteínas candidatas mediante inmunohistoquímica

Cortes histológicos consecutivos y con el mismo grosor de 2 μm fueron destinados para la validación de la expresión mediante la técnica de IHQ, una herramienta ampliamente usada en el diagnóstico oncológico. Su procesamiento inició con la desparafinación de los tejidos durante toda la noche a 70 – 80°C. Consecutivamente, se les sumergió en xilol durante 30' (2 veces). A continuación, se comenzó con la hidratación usando etanol (2 veces con etanol al 96% durante 5'), seguido a esto, se dejaron secar los tejidos para luego dejarlos reposar en PBS hasta su debido procesamiento. Siguiendo el mismo proceso de IFI, se realizó la recuperación de antígenos mediante una solución de citratos (Kit-BSB 0023 BioSB®). Se aislaron los tejidos con el Mini PAP Pen (Cat-008877 Invitrogen®) y se realizó el bloqueo de



peroxidasa endógena durante una hora (Kit-BSB 0023 BioSB®), posteriormente, se bloquearon los antígenos inespecíficos con una solución de bloqueo propia del protocolo durante 1 hora. En el siguiente paso se adicionó el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las muestras se lavaron empleando PBS durante 5' para eliminar el anticuerpo excedente, posteriormente, se adicionó el polidetectador (anticuerpo secundario) (Kit-BSB 0023 BioSB®) durante 30' a TA. De nuevo, se lavó el tejido con PBS para eliminar excedentes. Por último, se reveló la tinción, debido a que el polidetectador tiene acoplado la enzima peroxidasa de rábano (**HRP**), la cual reacciona con el peróxido de hidrogeno generando la oxidación y precipitación del cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (**DAB**), dicho cromógeno origina un producto de color café que se correlaciona con la concentración y ubicación de la proteína de interés. Previo a finalizar, se empleó hematoxilina para llevarse acabo la contra-tinción lo que facilitó la visualización de las estructuras celulares propias del tejido que no fueron teñidas con el DAB. Se finalizó con su montaje y conservación empleando Entellan (Cat. 1079610500 Merck Millipore®). El diagrama de trabajo seguido para esta técnica se esquematiza en la **Figura 13**.

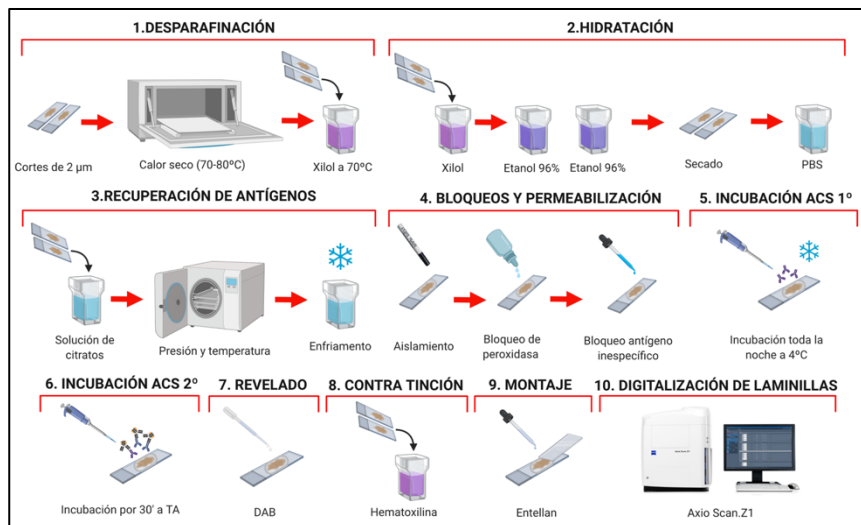


Figura 13. Diagrama general del procedimiento de IHQ.

Un paso previo para la cuantificación de la expresión fue el proceso de digitalización de laminillas, que se llevó acabo en el Departamento de Microscopía de la Unidad de Investigación Biomédica de la UNAM con sede en el INCan, con el apoyo del Dr. Carlo Cesar Cortés González, siendo él responsable de dicho proceso. El escaneo de todo el tejido se realizó mediante el microscopio de campo claro Axió Scan.Z1 (Carl Zeiss®). Posterior a esto, la patóloga Dra. Ana María Cano Valdéz del Departamento de Patología



post mortem del INCan evaluó la calidad de las tinciones, así como de delimitación de las zonas tumorales en los tejidos de cada laminilla digitalizada.

Las digitalizaciones de los tejidos también se generaron en un formato de salida RGB; sin embargo, para la cuantificación de la intensidad de la tinción de IHQ se utilizó el proceso de deconvolución, lo que permitió separar la inmunotinción (color café del cromógeno DAB) de la contra tinción (azul de la hematoxilina). De la misma forma que el procesamiento de las imágenes de IFI, cada imagen se transformó a un formato de 8-bits donde la intensidad de los pixeles tiene una escala de 0 (negro) a 255 (blanco), dando paso al cálculo de su densidad óptica (OD) (Figura 14) (Mustafa et al., 2015). De la misma manera, se asignó la intensidad del marcador basado en su distribución a partir de la mediana (Pelekanou et al., 2018).

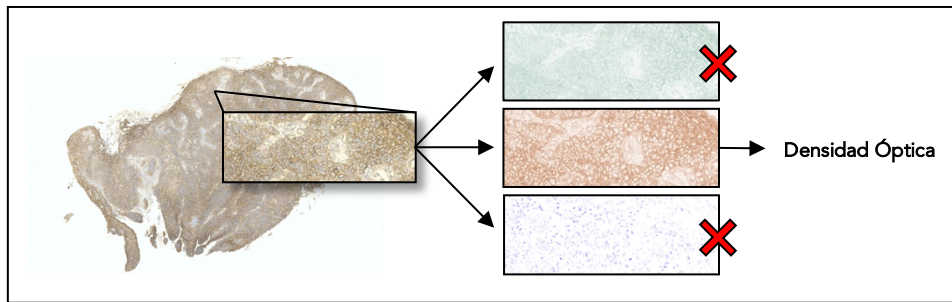


Figura 14. Diagrama general del procedimiento de IHQ.

El formato de digitalización de los casos de IHQ es de tipo RGB, lo que facilita el proceso de deconvolución de los colores que la componen. Para ello, el cromógeno DAB debe ser aislado de la contratinción de hematoxilina. Posteriormente, la imagen aislada fue transformada a un formato de escala de grises (8-bits) para dar paso a la cuantificación de la densidad de pixeles y finalmente asignar su OD.

Magnificación de las imágenes a 1X y 20X.

7.6.5 Análisis Estadístico

La base de datos conformada en el paquete estadístico SPSS® Versión 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY) permitió su respectivo análisis. Como primera instancia, se analizó la distribución de la variable cuantitativa (*edad*) mediante una prueba de normalidad: Kolmogorov-Smirnov. Respecto al análisis descriptivo, los datos se presentan como medias y \pm desviación estándar, solo sí las variables exhibieron una distribución normal, en caso contrario, se presentan como mediana y un intervalo de confianza al 95%. Por otra parte, los datos catalogados como variables cualitativas u ordinales se reportaron como frecuencias relativas y absolutas. Los análisis bivariados fueron aplicados a variables cualitativas haciendo uso de las pruebas de Chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher, según el caso. Para los análisis de supervivencia, se realizaron mediante el modelo no paramétrico



Kaplan-Meyer y sus funciones se compararon para la expresión de cada proteína mediante la prueba de Log Rank. Se estimaron los Hazard Ratio (**HR**) mediante el modelo de riesgos proporcionales o Regresión de Cox para cada una de las expresiones de las proteínas analizadas en el proyecto. En todos los análisis estadísticos que se llevaron a cabo se consideró una significancia estadística con el valor de $p < 0.05$ y sus respectivos intervalos de confianza se construyeron con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza de 95%)



8. RESULTADOS

8.1 Población de Estudio: Características Basales y Clinicopatológicas

La información que permitió estructurar la presente cohorte fue obtenida de los registros electrónicos del INCanet® en un periodo comprendido de 2005 a 2017. Como resultado de esto, se lograron recabar 151 expedientes pertenecientes a un diagnóstico de CaOF atendidos en el INCan, de los cuales, el 78.8 % pertenecieron al género masculino (119 casos). Por otra parte, haciendo uso de las medias móviles se analizó el comportamiento incidente de este periodo, el cual se determinó que no presenta una clara tendencia hacia la alza, como puede ser observado en la **Figura 15**.

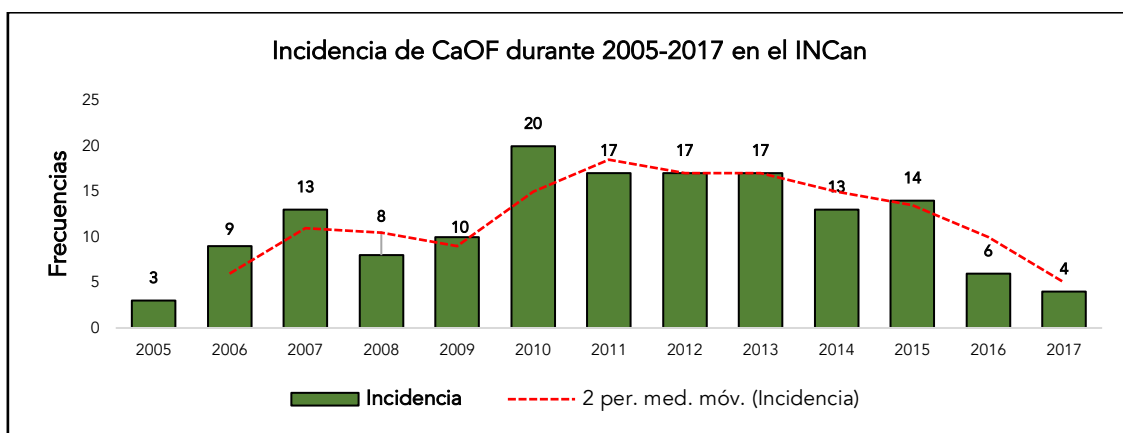


Figura 15. Representación gráfica de las incidencias para CaOF reportadas en el INCan durante 2005-2017.

Se diagnosticaron 151 nuevos casos en este periodo siendo la mayoría de estos representado por el género masculino (78.8 %). El análisis de medias móviles (línea naranja punteada) demuestra que no existe una clara tendencia hacia la alza de la incidencia registrada en este periodo de tiempo.

En orden a los criterios de selección establecidos para este proyecto, únicamente fueron excluidos los casos en los que: no fue posible conseguir el bloque de parafina, se presentó la interrupción del tratamiento de primera línea o debido a que la muestra no contenía tejido suficiente para las metodologías propuestas en el proyecto, partiendo de ello, únicamente 77 casos fueron procesados para obtener la prevalencia viral. Por otra parte, cumpliendo con los criterios de inclusión se analizaron 55 casos donde se dio inicio al protocolo de IFI, a la par, únicamente 29 casos fueron utilizados para su validación mediante IHQ. En la **Figura 16** se presenta el diagrama de trabajo.

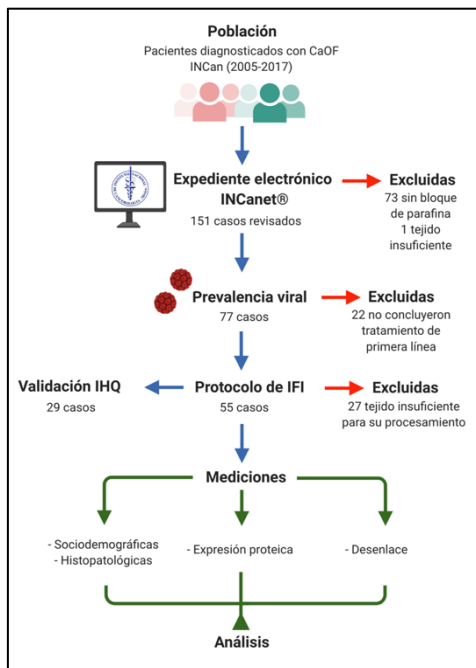


Figura 16. Diagrama de trabajo del presente proyecto.

La exclusión de los casos recabados fue con base a los criterios de selección establecidos.

Para estimar la prevalencia del VPH se emplearon 77 casos contemplados en el periodo previamente descrito, de modo que, un 20.78% resultaron positivos para la presencia viral, en contraste, el 79.22% de los casos fueron negativos a la presencia de VPH. Respecto a los tipos virales hallados en la cohorte final de análisis (Tabla 11), el VPH11 (BR) fue el de mayor frecuencia, seguido del VPH31 (AR) y en menor frecuencia los VPH6 (BR), 16, 18 y 33 (AR). Aunado a esto, ambas entidades presentan un comportamiento heterogéneo respecto a su incidencia, sin embargo, es notable que los casos VPH-Negativos dominan dicho registro (Figura 17).

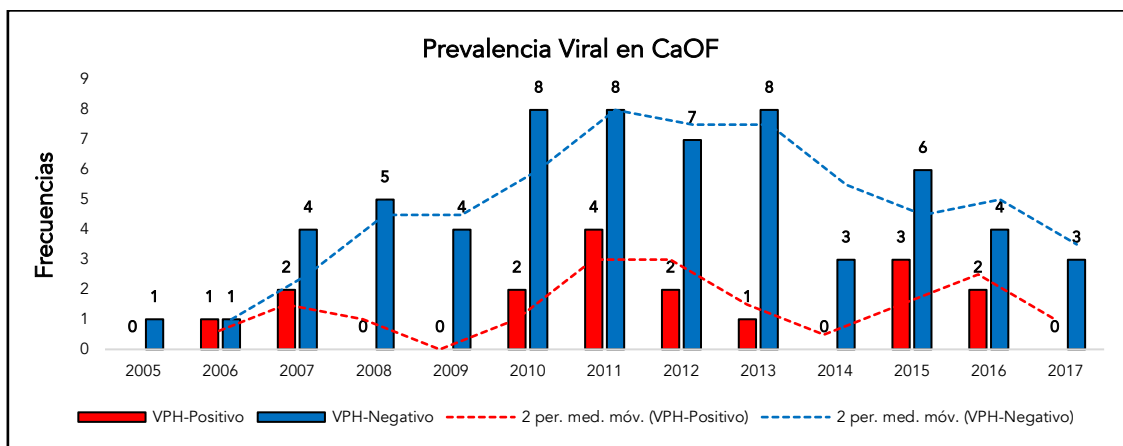


Figura 17. Representación gráfica de la prevalencia viral.

77 casos se emplearon para determinar la prevalencia viral, resultando en: VPH-Positivos (20.78 %) y VPH-Negativos (79.22 %). Respecto al análisis de medias móviles (líneas punteadas) se muestra que no existe una clara tendencia en la incidencia de ambas entidades, sin embargo, es notable que los casos VPH-Negativos presentaron una mayor frecuencia durante el periodo dado de 2005 a 2017.

Las características basales y sociodemográficas generales de la cohorte analizada (55 casos) se encuentran resumidas en la Tabla 8. De manera importante se observa que el predominio de la incidencia correspondió al sexo masculino, representando el 83.6% de la población de estudio. En lo referente a la edad al momento del diagnóstico de ambos sexos, estos presentaron una media de 60.91 años ($DE \pm 11.36$), los hombres tuvieron una media de



60.17 años ($DE \pm 10.16$) y las mujeres de 64.67 años ($DE \pm 16.49$). Por otra parte, de acuerdo con los expedientes, la mayoría de la población no presentó ninguna comorbilidad al momento de iniciar el tratamiento de primera línea (65.5%); sin embargo, en algunos pacientes se reportó diabetes mellitus e hipertensión.

La escolaridad fue de educación básica en un 60% de la población de estudio y el analfabetismo en 16.4%. Por lo que respecta a los datos clínico-patológicos de la población y en función a las toxicomanías presentes, se documentó el consumo de alcohol en un 76.4% y el de tabaco en 80% de los casos.

Clasificación histopatológica; el 67.3% de los casos fueron diagnosticados como carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado seguido por el carcinoma epidermoide poco diferenciado (18.2%). El CaOF se caracteriza por diagnosticarse en etapas avanzadas, un reflejo de ello fue que en nuestra población de estudio los estadios clínicos IVA y IVB estuvieron presentes en una mayor proporción, 36.4% y 30.9% respectivamente.

En lo que respecta a los esquemas de tratamiento, la concomitancia constituida por quimioterapia y radioterapia fue el tratamiento de primera línea comúnmente empleado (58.2%). De manera importante, el porcentaje de respuesta la cuál fue considerada como completa o parcial, estuvo presente en un 58.2% de la población estudiada. De igual forma, de los 23 casos con respuesta clínica completa (41.82%), 8 casos presentaron recurrencia temprana (< 2 años) y 5 casos recurrencia tardía (> 2 años).



Tabla 8. Características sociodemográficas y basales.

VARIABLES	n= 55 (100 %)
Edad	
Media para ambos sexos (\pm DE)	60.91* (\pm 11.36)
Hombres	60.17* (\pm 10.16)
Mujeres	64.67** (\pm 16.49)
Sexo	
Hombre	46 (83.6%)
Escolaridad	
Analfabeta	9 (16.4%)
Educación básica	33 (60%)
Educación media superior	6 (10.9%)
Educación superior	7 (12.7%)
Comorbilidad	
Ausente	36 (65.5%)
Presente	18 (32.7%)
Sin registro	1 (1.8%)
Toxicomanías	
Alcoholismo	
Sí	42 (76.4%)
No	12 (21.8%)
Sin registro	1 (1.8%)
Tabaquismo	
Sí	44 (80%)
No	10 (18.2%)
Sin registro	1 (1.8%)
Histología	
Carcinoma epidermoide <i>in situ</i>	1 (1.8%)
Carcinoma epidermoide basaloide	5 (9.1%)
Carcinoma epidermoide poco diferenciado	10 (18.2%)
Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado	37 (67.3%)
Sin registro	2 (3.6%)
Estadio Clínico	
EC II	2 (3.6%)
EC III	6 (10.9%)
EC IV A	20 (36.4%)
EC IV B	17 (30.9%)
No estadificable	10 (18.2 %)

*Prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov

Global: $p=0.200$

Hombres: $p=0.200$

**Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

Mujeres: $p=0.209$

Tabla 9. Características del tratamiento.

VARIABLES	n= 55 (100 %)
Esquema de tratamiento	
Cirugía	7 (12.7%)
Quimioterapia	5 (9.1%)
Quimioradioterapia	32 (58.2%)
Radioterapia	11 (20%)
Respuesta clínica al tratamiento	
	n= 47 (100 %)
Clínica completa	23 (48.9%)
Parcial	9 (19.1%)
Estable	9 (19.1%)
Progresión	6 (12.8%)
Recurrencia	
	n= 23 (100 %)
No presentó	10 (43.48%)
Temprana (<2 años)	8 (34.78%)
Tardía (>2 años)	5 (21.74%)



8.2 Presencia y Tipo Viral

Para el presente proyecto se llevaron a cabo dos metodologías con la finalidad de lograr determinar la presencia viral, como primera instancia se utilizó la técnica basada en la detección de la región codificante de L1 haciendo uso de los primers MY 09/11. En la **Figura 18a**, se muestra un gel resultante de dicha estrategia donde se logra observar la presencia de un amplicón de 450 pb el cual corresponde al producto esperado. Por otra parte, la técnica múltiple se basa en la amplificación del gen E6 lo que permite la detección simultánea de distintos tipos virales en una sola muestra (**Figura 18b**), de manera interesante y con ayuda de esta metodología se lograron detectar 3 co-infecciones que se resumen en la **Tabla 11**.

Posteriormente, para determinar la presencia viral se consideró el resultado positivo mediante cualquiera de las dos técnicas empleadas, con base en esto, se lograron determinar 12 casos con presencia al VPH (**Tabla 10**). De manera interesante solo un caso resultó positivo por ambas metodologías. Los tipos virales con mayor frecuencia fueron de BR: VPH11 seguido del VPH6 y en menor frecuencia los tipos de AR: 16, 18, 31 y 33, todos ellos se encuentran resumidos en la **Tabla 11**.

Tabla 10. Presencia viral determinada.

METODOLOGÍA	n= 55
MY 09/011	
	Frecuencia (%)
Positivo	3 (5.5%)
Negativo	52 (94.5%)
MPCR	
Positivo	10 (18.2%)
Negativo	45 (81.8%)
PRESENCIA VIRAL	
Detectada	12 (21.8%)
No detectada	43 (78.2%)

Tabla 11. Tipos virales determinados

TIPOS VIRALES (MPCR)	
Alto riesgo	Frecuencia
16	1
18	1
31	2
33	2
52	0
58	0
Bajo riesgo	
6	2
11	8
CO-INFECCIONES	
VPH: 11,16,18 y 31	1
VPH: 31 y 33	1
VPH: 6 y 11	1

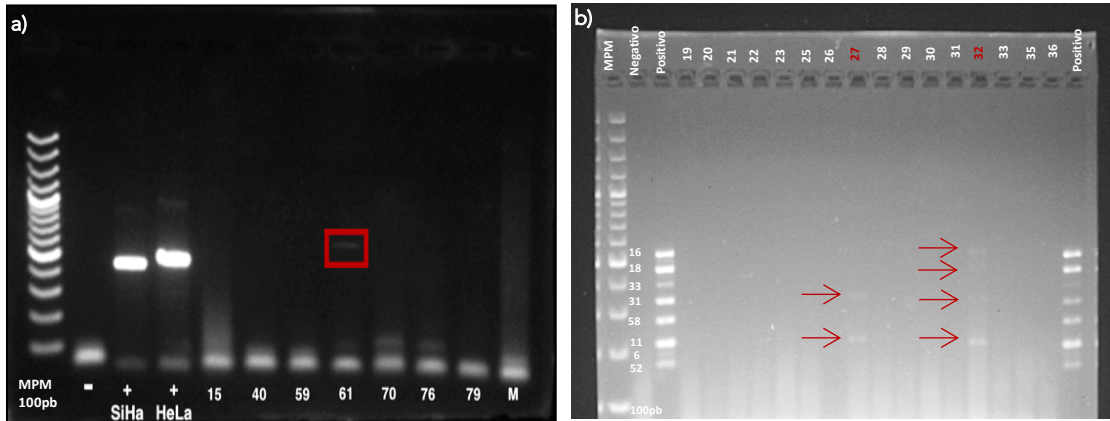


Figura 18. Resultados de la detección viral en casos de CaOF.

a) Se muestra un gel de agarosa al 2.5%, es determinada la presencia del VPH empleando los *primers* MY 09/11, como controles positivos fueron utilizadas dos líneas celulares que albergan copias de VPH tipo 16 y 18 (SiHa y HeLa, respectivamente), en el recuadro rojo se señala un caso positivo. **b)** Gel de agarosa al 2.5 % que logra evidenciar los productos resultantes de la detección múltiple en casos de CaOF, el control positivo es provisto por el kit el cual contiene los 8 tipos virales detectables. Las flechas señalan dos casos positivos para VPH, en ambas situaciones se puede evidenciar una múltiple infección, el caso 27 presentó los genotipos 31 y 11, respecto al caso 32 podemos observar la detección de 4 tipos virales (16, 18, 31 y 11). En ambos protocolos el control negativo no contenía material genético. (MPM) Marcador de peso molecular.

8.3 Determinar la Expresión de Proteínas Candidatas en Casos con Diagnóstico de CaOF

Los patrones de expresión y localización de los marcadores que fueron utilizados para IFI se validaron previamente por el servicio de Patología, donde cada marcador se procesó inicialmente en tejidos que tuviesen la expresión positiva, de esta manera los marcadores evaluados fueron: β -Catenina (BD Biosciences, 610154), Caveolina 1 (ThermoFisher, PA1-604), Claudina 4 (ThermoFisher, 32-9400) y EGFR (Abcam, ab32077), en consideración a la evaluación del estrés oxidante se emplearon los marcadores DNA/RNA Damage (Abcam, 62623) y CellRox (ThermoFisher, C10444), todos estos en sus respectivos tejidos control. En la **Figura 19** se muestran imágenes representativas de los controles de dichas tinciones.

Como se detalló en la sección de Materiales y Métodos, las intensidades por marcador fueron asignadas con base a su respectiva mediana, dicho valor fue establecido como punto de corte para dar paso a la clasificación de ALTO o BAJO, según fue el caso. En la **Tabla 12** se presenta la distribución de las intensidades por cada marcador utilizado.

Aunado a esto, se realizaron pruebas de asociación para determinar si la presencia viral influía en la expresión de dichos marcadores; se determinó que no existió diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las proteínas analizadas.

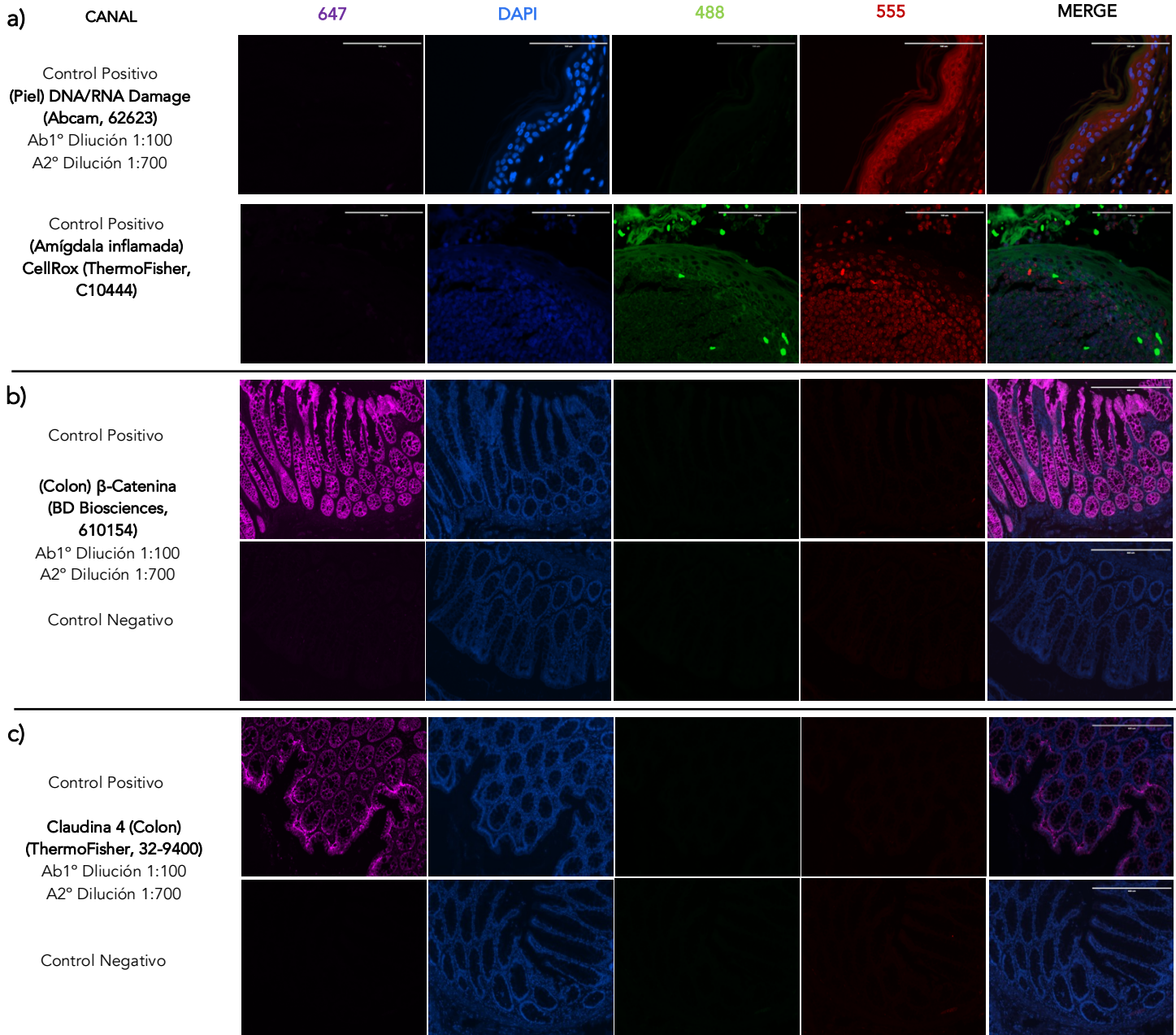


Tabla 12. Distribución de las intensidades por marcador (IFI) y su expresión asociada a la presencia viral.

MARCADOR	DISTRIBUCIÓN*	PRESENCIA VIRAL	**p
<i>DNA Damage</i>	Alto: 29 (52.7%)	(+): 5 (-): 24	0.736
	Bajo: 25 (45.5%)	(+): 6 (-): 19	
	No valorable: 1 (1.8%)	N/A	
<i>Cell Rox</i>	Alto: 29 (52.7%)	(+): 5 (-): 24	0.736
	Bajo: 25 (45.5%)	(+): 6 (-): 19	
	No valorable: 1 (1.8%)	N/A	
β -Catenina	Alto: 25 (45.5%)	(+): 4 (-): 21	0.321
	Bajo: 24 (43.6%)	(+): 7 (-): 17	
	No valorable: 6 (10.9%)	N/A	
<i>EGFR</i>	Alto: 25 (45.5%)	(+): 4 (-): 21	0.321
	Bajo: 24 (43.6%)	(+): 7 (-): 17	
	No valorable: 6 (10.9%)	N/A	
<i>Caveolina 1</i>	Alto: 24 (43.6%)	(+): 7 (-): 17	0.494
	Bajo: 23 (41.8%)	(+): 4 (-): 19	
	No valorable: 8 (14.5%)	N/A	
<i>Claudina 4</i>	Alto: 24 (43.6%)	(+): 4 (-): 20	0.318
	Bajo: 23 (41.8%)	(+): 7 (-): 16	
	No valorable: 8 (14.5%)	N/A	
<i>p16</i>	Alto: 25 (45.5%)	(+): 5 (-): 20	0.742
	Bajo: 24 (43.6%)	(+): 6 (-): 18	
	No valorable: 6 (10.9%)	N/A	

*En cada marcador la suma no corresponde al total de casos (n=55) esto debido a que algunas muestras no tenían tejido suficiente para su debido procesamiento.

**Estadístico exacto de Fisher



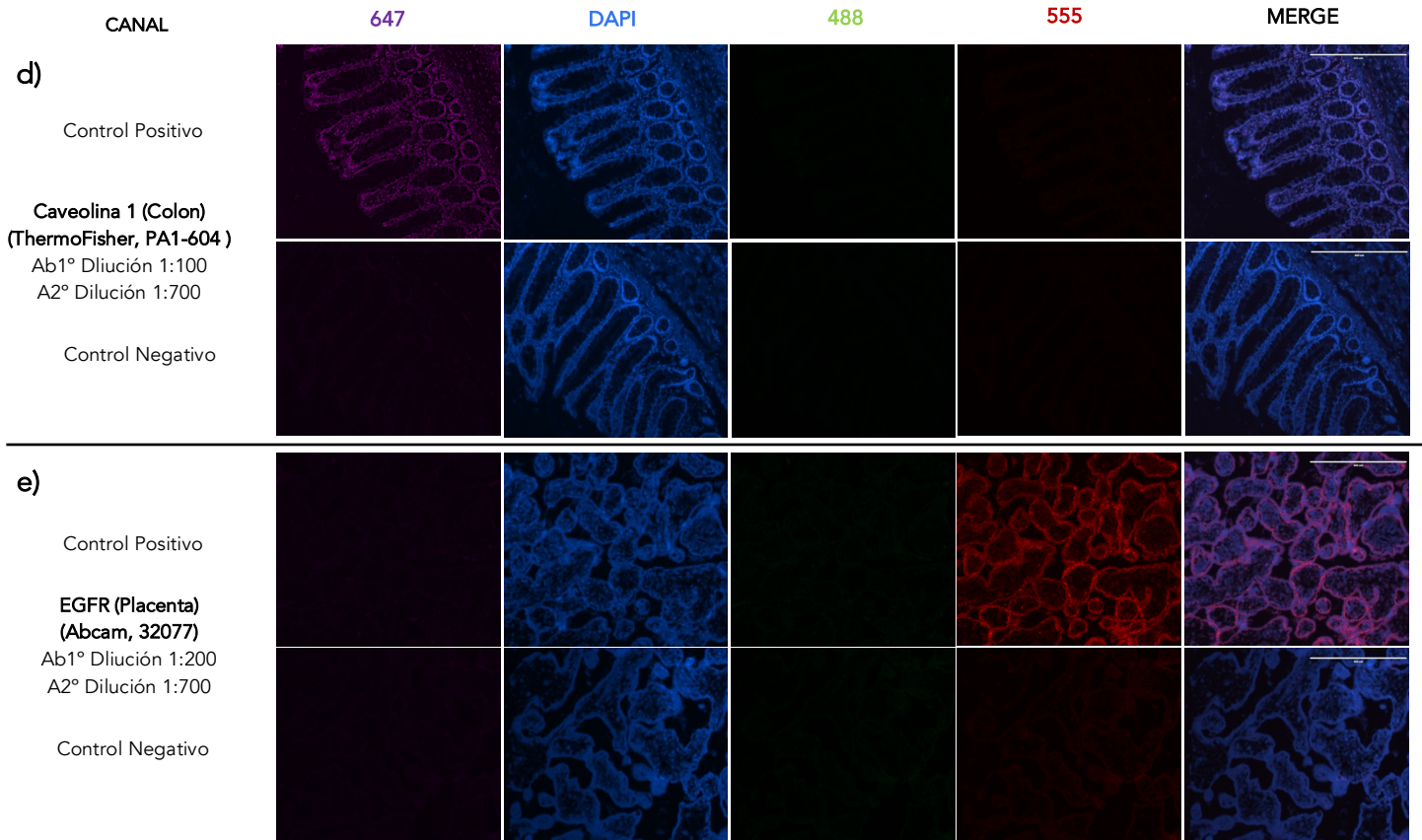


Figura 19. Resultados de la expresión múltiple mediante IFI.

Se utilizaron tejidos de expresión positiva para la validación de cada marcador, obteniéndose la localización esperada. **a)** Expresión y validación de los marcadores de estrés oxidativo siendo utilizados como tejidos control, piel y amígdala inflamada **b), c) y d)** Fueron utilizados secciones de colon sano para la expresión de Caveolina 1, Claudina 4 y β -Catenina e) La expresión de EGFR logró validarse en placenta. Cada tejido fue analizado por el servicio de patología. *Magnificación de las imágenes a 10X.*



8.4 Validación de la Expresión de Proteínas Candidatas Mediante Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo este objetivo se empleó el método de referencia ampliamente utilizado en el diagnóstico oncológico actual, la IHQ. Primero, se realizó la estandarización de los anticuerpos en diferentes diluciones y tejidos con expresión positiva, de manera exitosa se lograron establecer las condiciones para la expresión de las siguientes proteínas: β -Catenina (BD Biosciences, 610154), Claudina 4 (ThermoFisher, 32-9400) y EGFR (Abcam, ab32077) (**Figura 20**). En cuanto a la detección de p16, dicha tinción se llevó a cabo empleando el sistema automatizado Ventana (Roche, 6695258001) debido a que éste se encuentra completamente estandarizado (**Figura 20d**). Dichas condiciones fueron aprobadas por el servicio de Patología determinando su eficacia para analizar la expresión en los casos de CaOF.

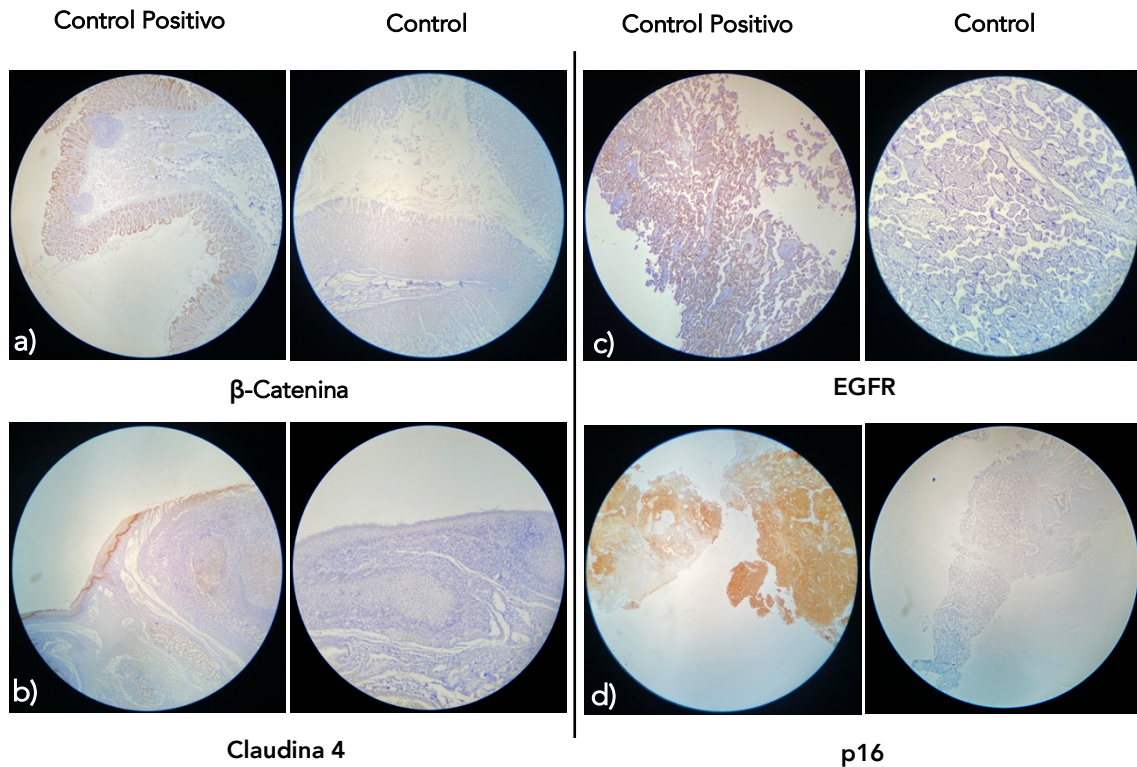


Figura 20. Imágenes representativas de la validación de la expresión de los marcadores mediante IHQ.

Igualmente, para esta metodología se utilizaron para cada marcador tejidos de expresión positiva, lográndose obtener la expresión esperada. **a)** Tejido placentario empleado para la expresión de EGFR a una dilución 1:200, **b)** Expresión de Claudina 4 en amígdala a una dilución 1:200, **c)** Colon fue utilizado para la expresión de β -Catenina a una dilución 1:75 y **d)** Tejido proveniente de carcinoma cervical para la detección del marcador p16. Cada tejido fue valorado y aprobado por el servicio de patología. *Magnificación de las imágenes a 10X.*



8.5 Relación de la Supervivencia Global con la Presencia de VPH y la Expresión de las Proteínas Candidatas Mediante IFI en CaOF

Como primera instancia se determinó el tiempo de supervivencia global (SG) para la presente cohorte, esto se logró empleando la información proveniente de los registros electrónicos del INCanet. Dicho análisis es independiente de la expresión de los marcadores analizados y se obtuvo como resultado una mediana de 11.92 meses (IC 95%: 3.87 – 19.97) (Figura 21).

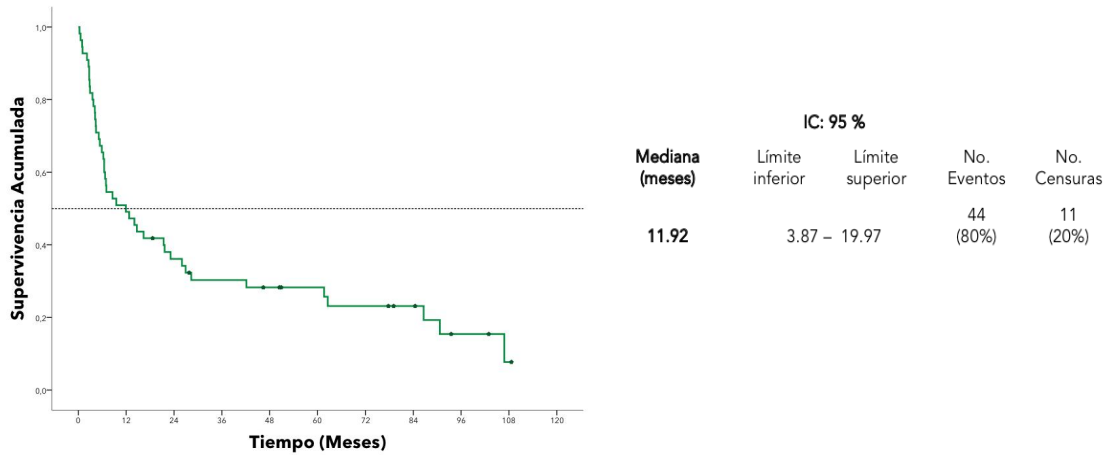


Figura 21. Curva de SG de la cohorte analizada.

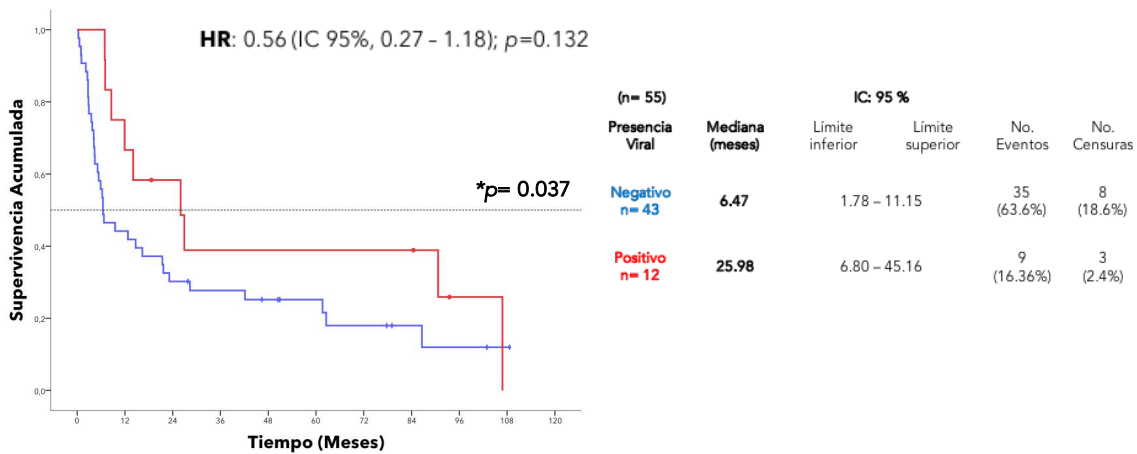


Figura 22. Curva de SG de la cohorte analizada respecto a la presencia viral.

De manera importante, al realizar el análisis de la SG en función a la presencia viral se encontró diferencia estadísticamente significativa (* $p=0.037$) indicando que aquellos pacientes VPH-positivos exhibieron un mayor tiempo de SG. La mediana presentada en los casos positivos a la presencia viral fue de 25.98 meses (IC 95%: 6.80 – 45.16), en contraste, los casos VPH-Negativos registraron una mediana de 6.47 meses (IC 95%: 3.87–19.97).



Cabe señalar que, al realizarse el análisis de riesgos proporcionales de Cox para estimar el valor de *hazard ratio* (por sus siglas en inglés **HR**) no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.132$), permitiendo determinar que la presencia viral no disminuyó el riesgo de muerte en la cohorte analizada (**Figura 22**).

En línea con los marcadores propuestos, el marcador DNA/RNA Damage mostró distintas medianas de SG respecto a sus intensidades; para el nivel bajo fue de 6.27 meses (IC 95%: 4.07 – 8.47) y para su nivel alto de 21.38 meses (IC 95%: 9.64 – 33.13), a pesar de que la prueba careció de significancia estadística ($p=0.052$), se logra observar un comportamiento clínico sustancial, es decir, casos que presentaron un nivel alto del marcador exhibieron una mayor SG. Por otra parte, el análisis de la SG en relación con las especies reactivas de oxígeno se determinó con el marcador CellRox presentó para su nivel bajo mostró una mediana de 21.65 meses (IC 95%: 0 – 51.65) y para su nivel alto de 8.57 meses (IC 95%: 4.01 – 13.13), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.560$). Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis de riesgos proporcionales de Cox para ambos marcadores basados en una alta expresión, ambos no presentaron significancia estadística (DNA Damage, $p=0.174$ y para CellRox $p=0.561$), indicando que ninguno de estos marcadores impactó en la SG de la cohorte analizada (**Figura 23**).

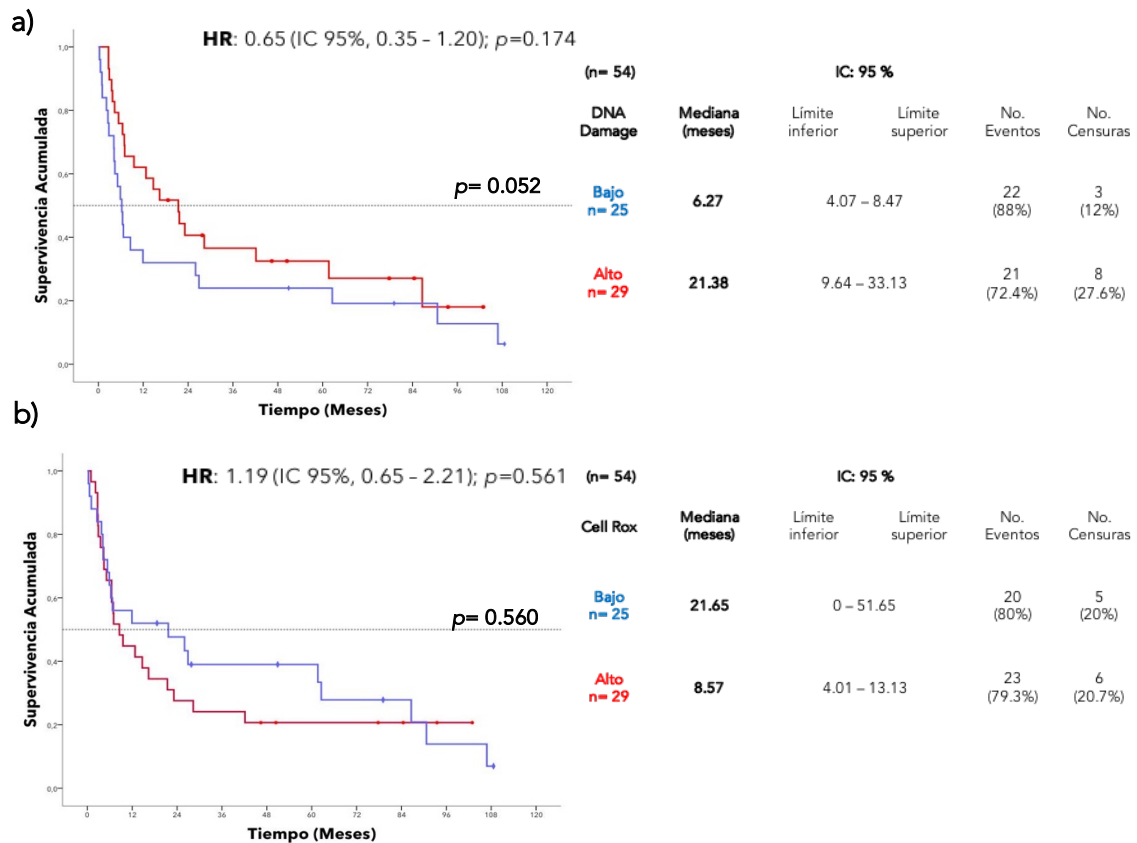
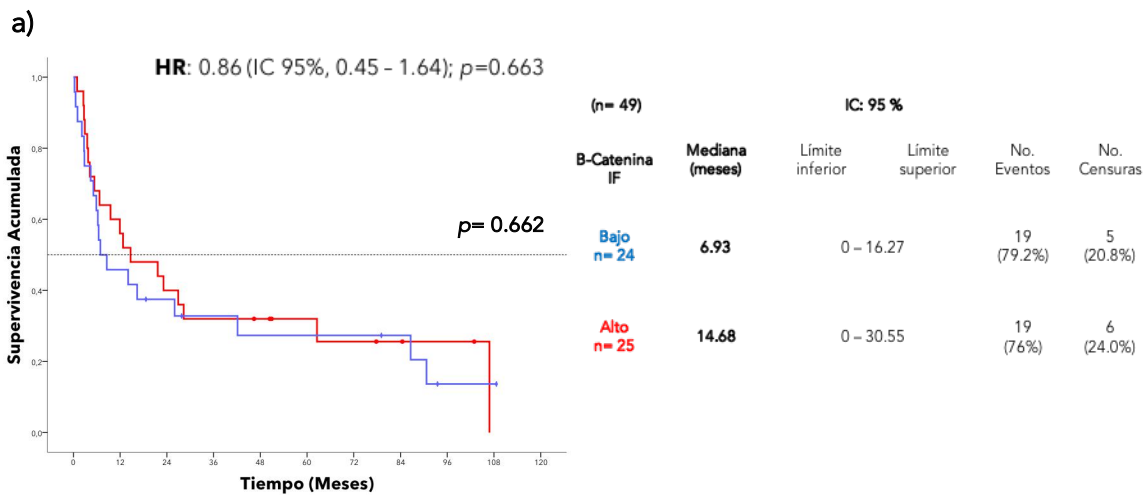


Figura 23. Curva de SG de la cohorte analizada respecto al estrés oxidante.

a) Gráfico correspondiente al marcador DNA/RNA Damage b) Gráfico construido con CellRox.



Analizando la expresión de β -Catenina y su relación con la SG, se presentaron las siguientes medianas: para el nivel bajo fue de 6.93 meses (IC 95%: 0 – 16.27) y para el nivel alto de 14.68 meses (IC 95%: 0 – 30.55). La curva de SG en función a este marcador no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.662$) y se observa en el gráfico un comportamiento similar para ambos patrones de expresión. Por otra parte, al realizarse el análisis de riesgos proporcionales en función a una alta expresión de β -Catenina, no se presentó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.663$), estableciéndose que dicho marcador no logró impactar en la SG de la cohorte (**Figura 24**).



b)

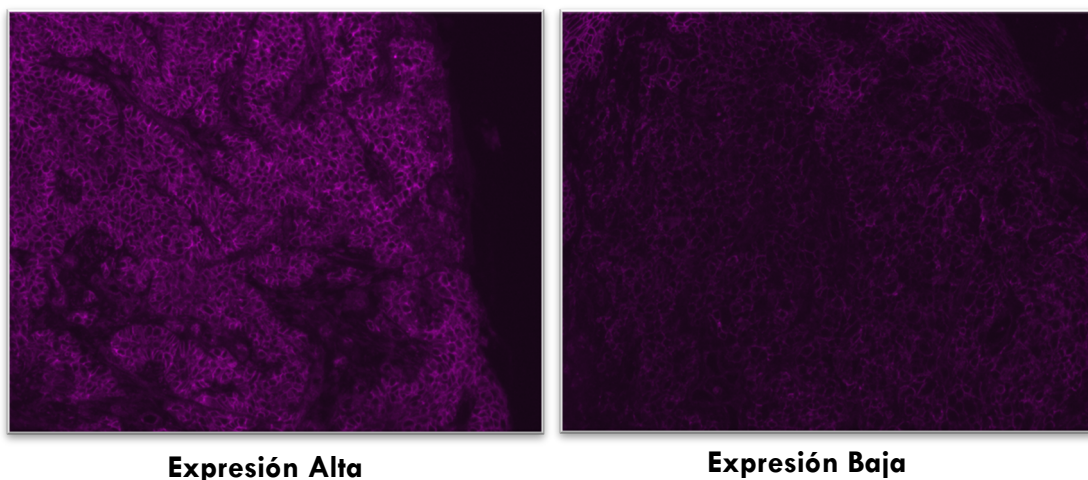
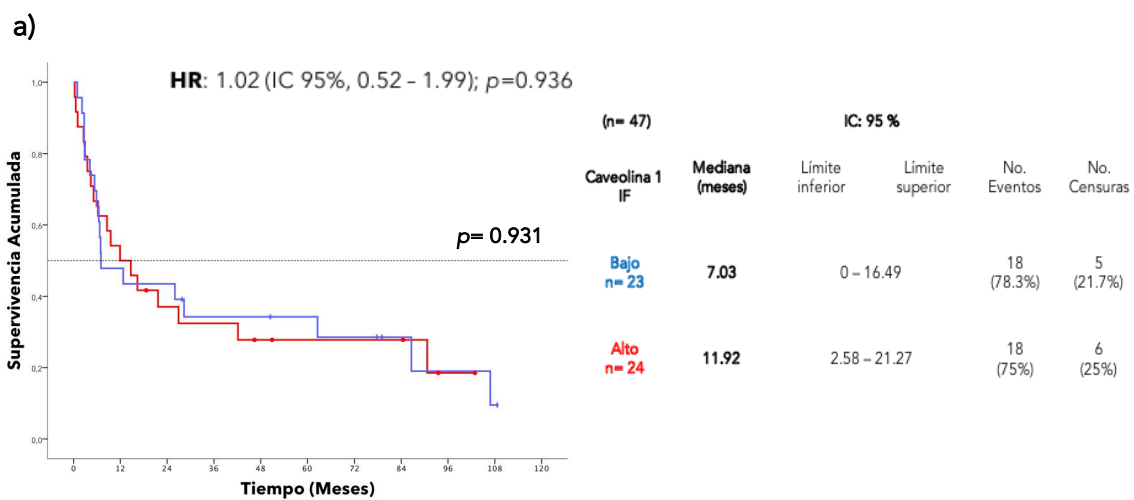


Figura 24. Curva de SG y la expresión de β -Catenina.

a) Curva estimada respecto a los niveles de expresión de β -Catenina b) Digitalizaciones de dos casos representativos de la expresión del marcador, se logra distinguir una expresión en membrana.



De acuerdo con la expresión de Caveolina 1 y su relación con la SG, no se observó alguna diferencia estadísticamente significativa ($p=0.931$); en este análisis resultaron las siguientes medianas: nivel bajo fue de 7.03 meses (IC 95%: 0 – 16.49) y el nivel alto de 11.92 meses (IC 95%: 2.58 – 21.27). En el gráfico resultante se logra apreciar un comportamiento similar entre ambos patrones de expresión. Además, se realizó el análisis de riesgos proporcionales en función a una alta expresión de Caveolina 1, en el cual no se encontró significancia estadística ($p=0.936$) y se determinó que dicha proteína no contribuyó en el pronóstico del desenlace de la enfermedad (**Figura 25**).



b)

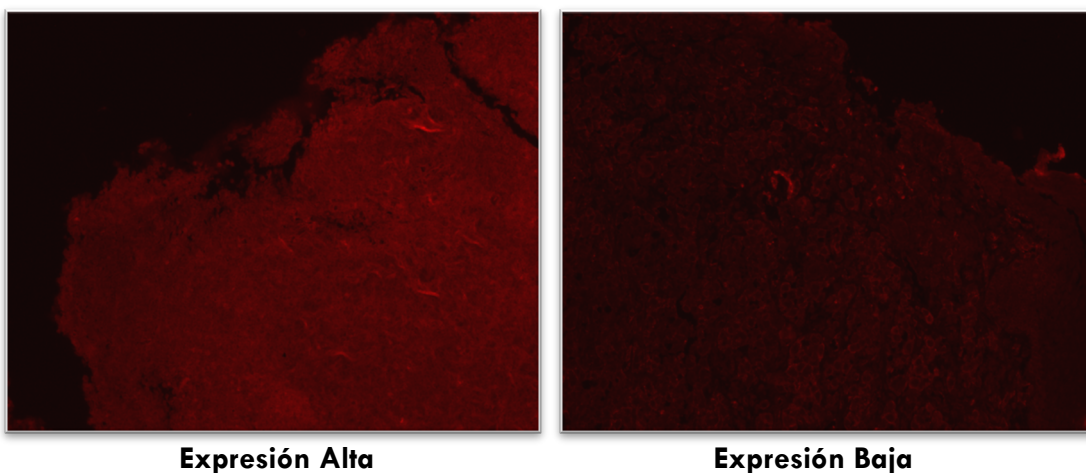
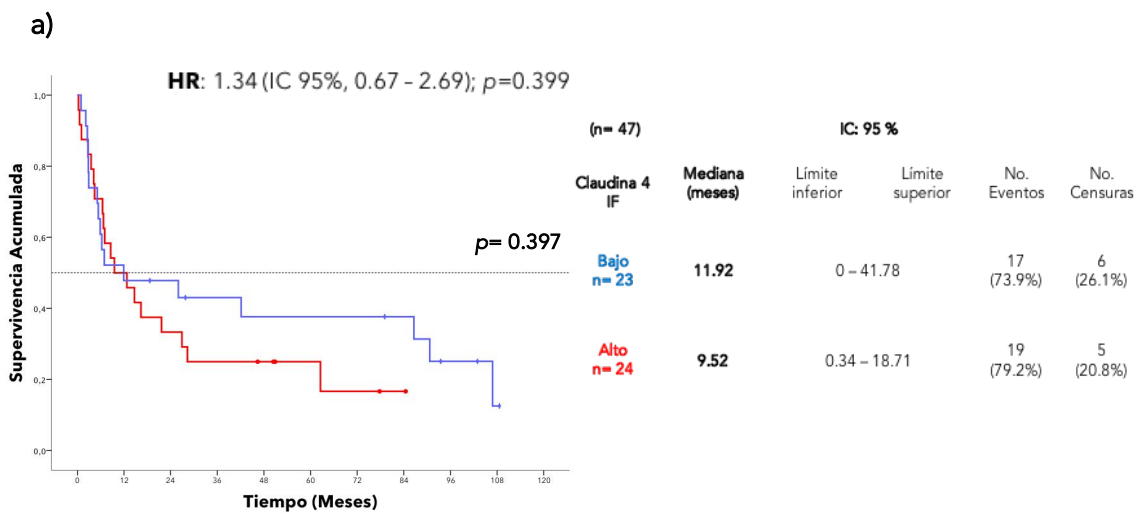


Figura 25. Curva de SG y la expresión de Caveolina 1.

a) Curva estimada respecto a los niveles de expresión de Caveolina 1 b) Digitalizaciones de dos casos representativos de la expresión del marcador.



En función a la expresión de Claudina 4 y su relación con la SG, no se halló diferencia estadísticamente significativa ($p=0.397$); en este análisis los resultados fueron las siguientes medianas: 11.92 meses para los casos con nivel bajo (IC 95%: 0 – 41.78) y 9.52 meses con nivel alto (IC 95%: 0.34 – 18.71). En el gráfico resultante se muestra que, a pesar de no presentar significancia estadística, los patrones de expresión presentan una sutil diferencia en el comportamiento de las curvas estimadas; al realizarse el análisis de riesgos proporcionales de Cox, el cual no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.399$), se concluyó que una alta expresión de Claudina 4 no contribuyó en la predicción del desenlace clínico (Figura 26).



b)

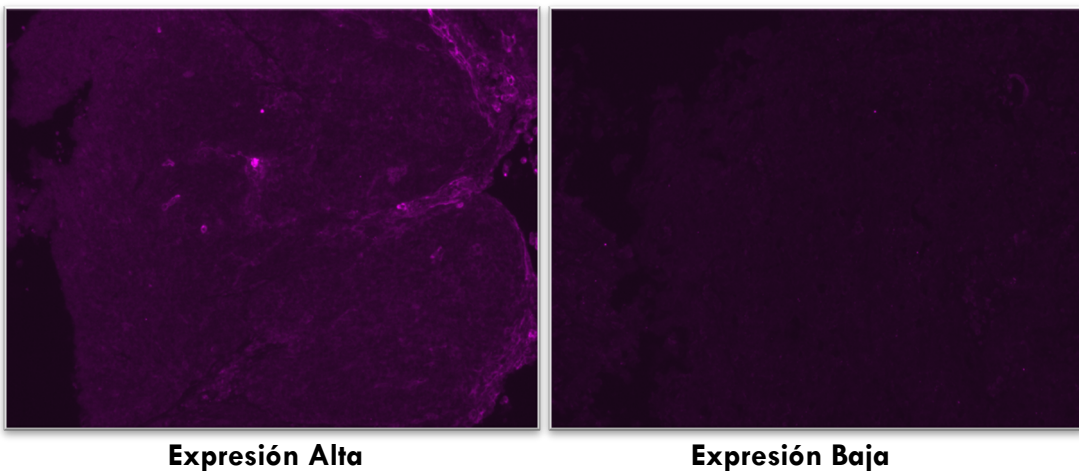
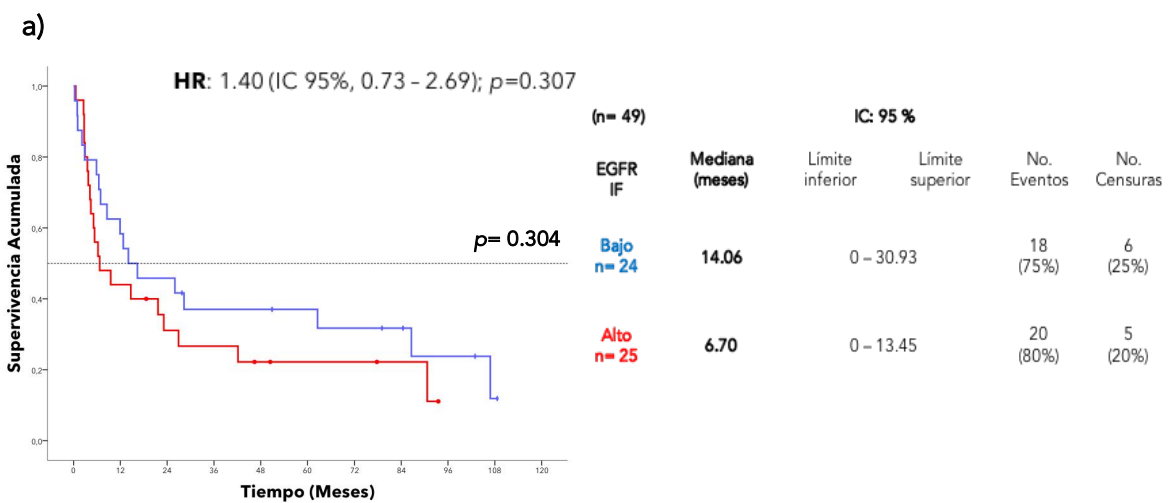


Figura 26. SG y la expresión de Claudina 4.

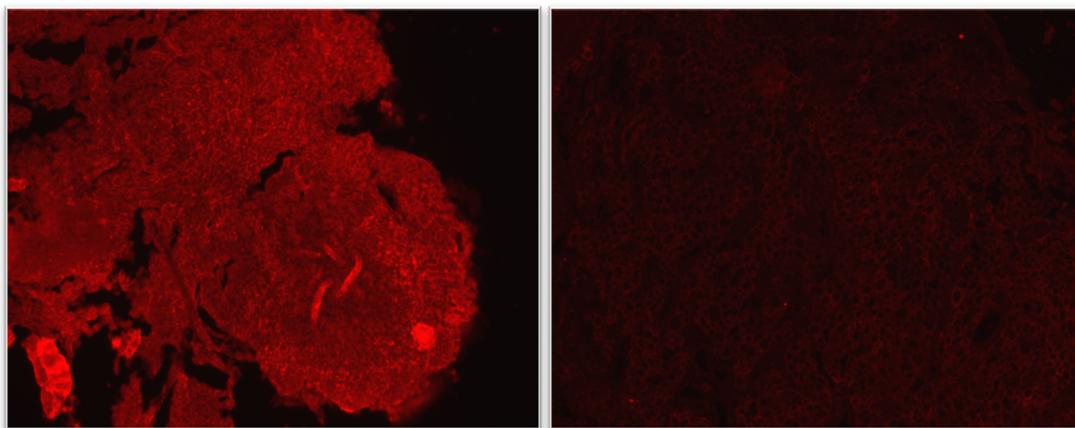
a) Curva estimada respecto a ambos niveles de expresión de Claudina 4 b) Digitalizaciones de dos casos representativos de la expresión del marcador.



La evaluación de la expresión de EGFR en relación con la SG no logró reflejar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.304$); las estimaciones de las medianas fueron las siguientes: nivel bajo 14.06 meses (IC 95%: 0 – 30.93) y nivel alto 6.70 meses (IC 95%: 0 – 13.45), sin embargo, como puede observarse en el gráfico un nivel de expresión alto presentó una tendencia asociada a la aparición del evento en un menor tiempo. Al realizarse el análisis de riesgos proporcionales de Cox y no encontrarse diferencia estadísticamente significativa ($p=0.307$) se concluyó que una alta expresión de EGFR detectada mediante IFI no logró pronosticar el desenlace clínico en la presente cohorte (**Figura 27**).



b)



Expresión Alta

Expresión Baja

Figura 27. SG y la expresión de EGFR.

a) Curva estimada respecto a los niveles de expresión de EGFR b) Digitalizaciones de dos casos representativos de la expresión del marcador, en ambas intensidades se observa una expresión en membrana.



8.6 Validación de la Expresión de las Proteínas Candidatas en CaOF y su Relación con la Supervivencia Global

Por otra parte, respecto al resultado de la expresión de los marcadores propuestos mediante IHQ y su relación con la SG, únicamente fueron analizados 29 casos de la cohorte debido a la carencia de tejido. Como primer resultado se muestra la valoración de la proteína p16, siendo este un marcador subrogado de la infección por VPH, de manera importante se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($*p=0.012$) en SG; asimismo, puede observarse en el gráfico que la expresión de esta proteína está asociada a un mejor pronóstico, las estimaciones de las medianas fueron las siguientes: negativo 6.27 meses (IC 95%: 5.50 – 7.04) y positivo 106.84 meses (IC 95%: 15.59 – 198.09). Se logró encontrar diferencia estadísticamente significativa al realizar el análisis de riesgos proporcionales de Cox, el HR resultante fue de 0.29, dicho en otras palabras, existe una reducción del riesgo de muerte en un 71 % al presentarse una tinción positiva para p16 (Figura 28).

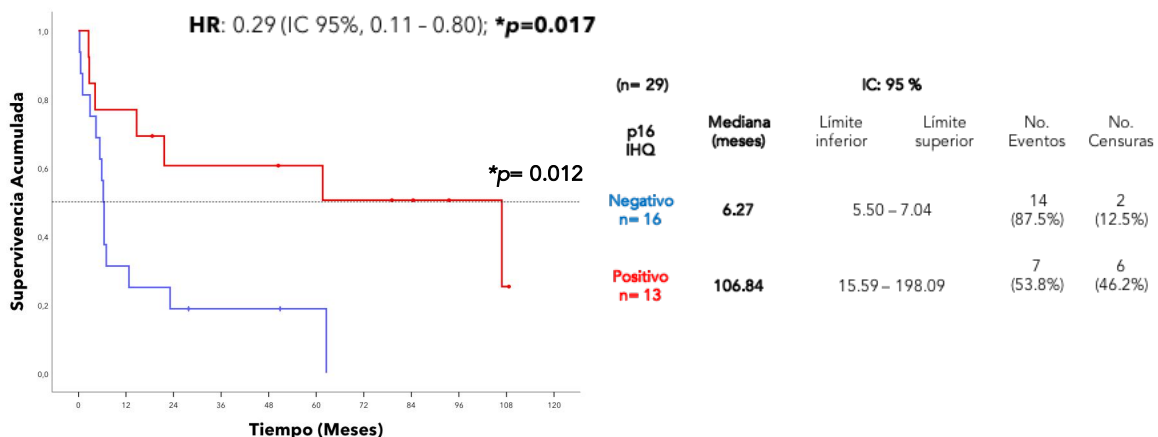


Figura 28. Expresión de p16 mediante IHQ y su relación con la SG.

Siguiendo con el análisis de los marcadores, al evaluar la expresión mediante IHQ de β -Catenina y la SG, no se detectó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.418$). Las estimaciones de las medianas fueron las siguientes: para nivel bajo fue de 12.74 meses (IC 95%: 0 – 31.08) y para el nivel alto de 5.38 meses (IC 95%: 0 – 17.69). En el gráfico, puede observarse una sutil diferencia entre las curvas y sus intensidades asignadas, sin embargo, el HR no se reflejó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.421$), por ello se estableció que no tuvo aplicación como marcador pronóstico en la SG de los casos analizados (Figura 29).

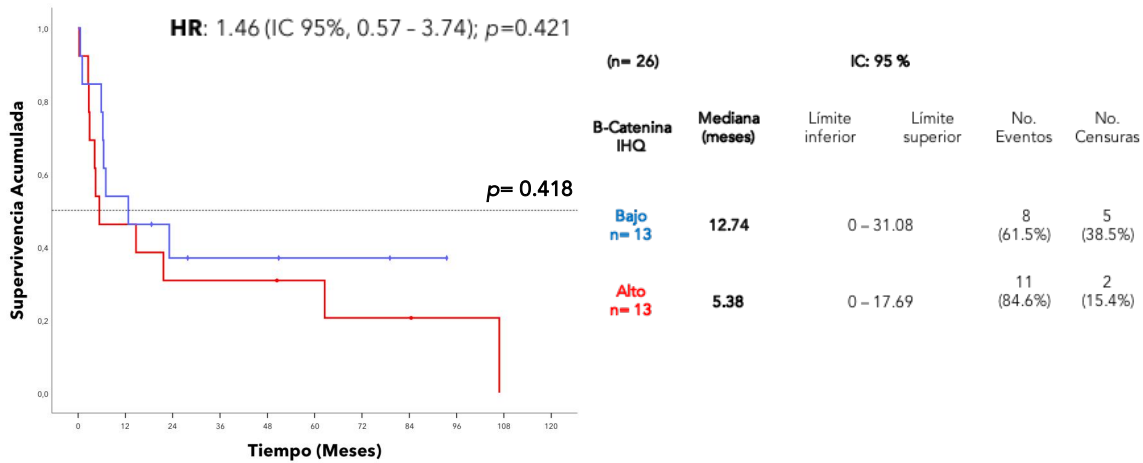


Figura 29. Expresión de β -Catenina mediante IHQ y su relación con la SG.

Posteriormente, analizando la expresión de Claudina 4 y su asociación con la SG, se evidenció que los niveles de esta proteína no lograron impactar en dicho estimador debido a que no mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.514$), sus respectivas estimaciones de las medianas fueron las siguientes: nivel bajo 6.27 meses (IC 95%: 5.0 – 7.54) y nivel alto 21.65 meses (IC 95%: 6.17 – 37.13). A pesar de que puede observarse en el gráfico que la expresión baja se ve relacionada a un pronto desenlace desfavorable la estimación del HR ($p=0.516$) logró establecer que dicha expresión proteica no va en orden con el pronóstico de los casos analizados de la cohorte (Figura 30).

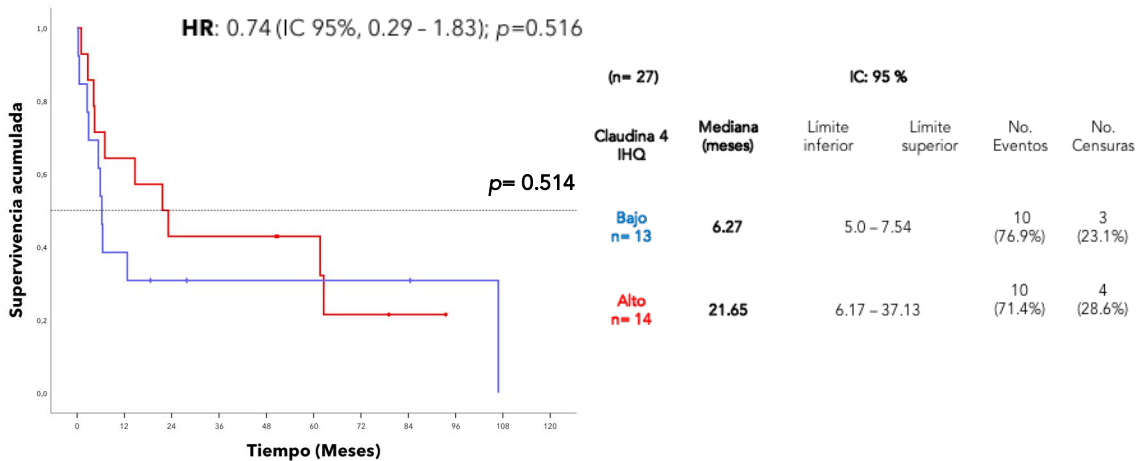


Figura 30. Expresión de Claudina 4 mediante IHQ y su relación con la SG.

Por último, la expresión de EGFR mostró que una alta expresión logró impactar en la SG de manera significativa ($*p=0.031$). Se estimaron sus medianas: expresión baja 61.63 meses (IC 95%: 0 – 134.63) y expresión alta 4.20 meses (IC 95%: 0.02 – 8.38). En el gráfico resultante



puede observarse que una alta expresión se ve relacionada a un desenlace desfavorable y esto se logra relacionar con lo reportado en la literatura. Mediante el análisis de riesgos proporcionales de Cox, se determinó un HR de 2.19, que se entiende que una alta expresión de EGFR aumenta el riesgo de muerte en dos veces; sin embargo, dicho parámetro no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p=0.103$), lo cual deja de manifiesto que este marcador, bajo las condiciones del presente proyecto, no es una herramienta con valor pronóstico (Figura 31).

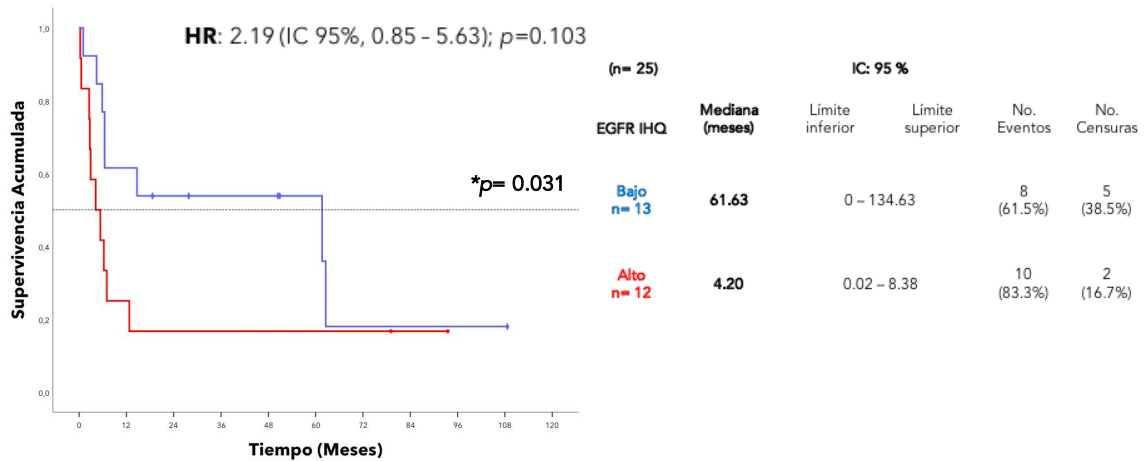


Figura 31. Expresión de EGFR mediante IHQ y su relación con la SG.



8.6 Validación de la Expresión de las Proteínas Candidatas en CaOF y su Relación con la Supervivencia Libre de Enfermedad

Previamente fue mencionado que 23 casos lograron presentar una respuesta clínica completa con base en los criterios RECIST; de este subconjunto únicamente 13 casos presentaron algún tipo de recurrencia (temprana o tardía). Debido a ello, se realizó su gráfico de Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) donde se obtuvo una mediana de 54.99 meses para dicho evento clínico (Figura 32).

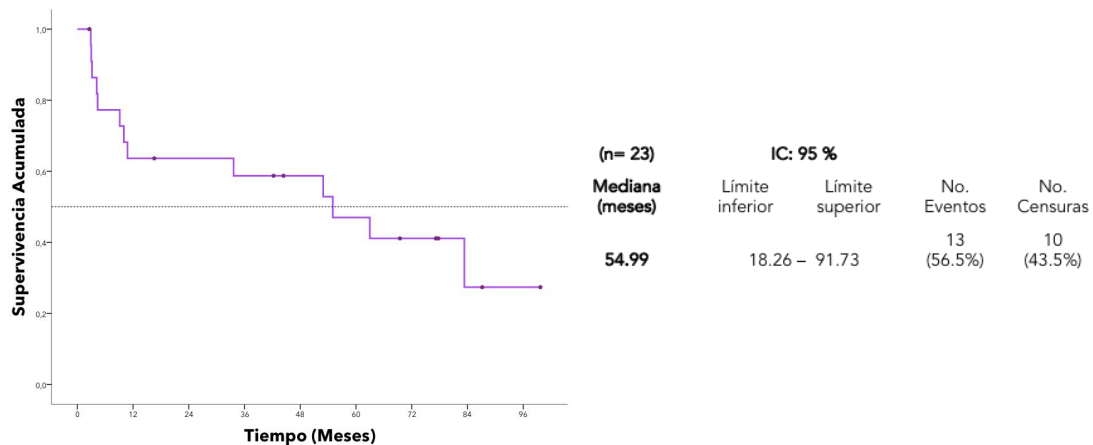


Figura 32. Curva de SLE para los 23 casos respondedores de clínica completa.

Posterior a este resultado, se analizó la asociación entre la presencia viral y la SLE, las medianas determinadas fueron: 52.92 meses para un resultado negativo (IC 95%: 0 –124.34) y 62.98 meses para el positivo (IC 95%: 5.45 – 120.51) dicha prueba no se mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p=0.739$). A pesar de que el comportamiento en la curva muestra una sutil diferencia en función a la aparición de dicho evento, el HR resultante tampoco mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.739$), por lo que se estableció que la presencia viral no logró pronosticar la aparición del evento en la presente cohorte (Figura 33).

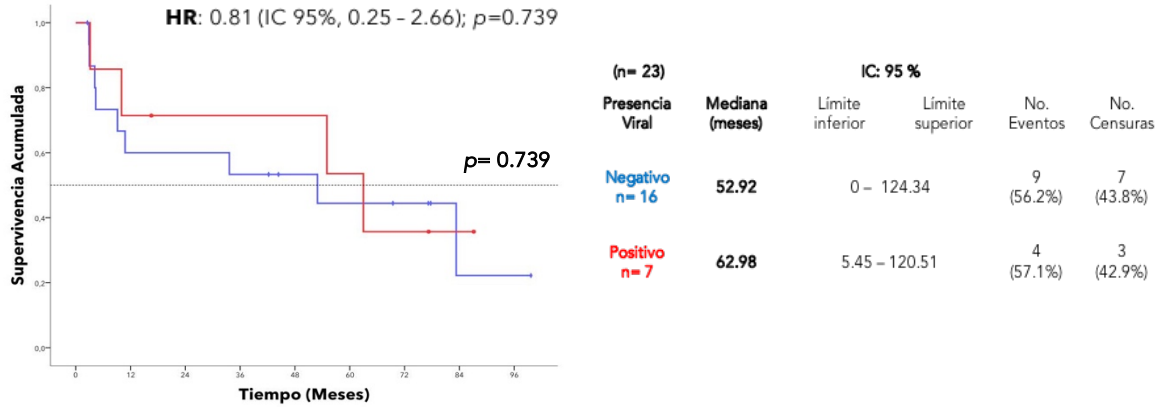


Figura 33. Curva de SLE en relación con la presencia viral.

De manera importante el marcador p16-IHQ presentó diferencia estadísticamente significativa ($*p=0.016$) respecto al análisis de la SLE, de modo que, la positividad a p16 logró establecer que la aparición del evento fuese tardía, como logra apreciarse en su gráfico (Figura 34); para reforzar este hallazgo se llevó acabo el análisis de riesgos proporcionales de Cox, el cual presentó diferencia estadísticamente significativa ($*p=0.046$) y como resultado se obtuvo un HR de 0.10, concluyéndose que, la positividad a p16 disminuye el riesgo de recurrencia en un 90 %. Resulta destacable dicho hallazgo, debido a que esta proteína solo ha sido propuesta como un marcador predictor en un estudio que evaluó SLE en pacientes con HNC previamente tratados con resección quirúrgica para ser asignados a un tratamiento que consistió en combinación de terapias con Cetuximab como se propuso en el ensayo clínico RTOG-0234 (Harari et al., 2014).

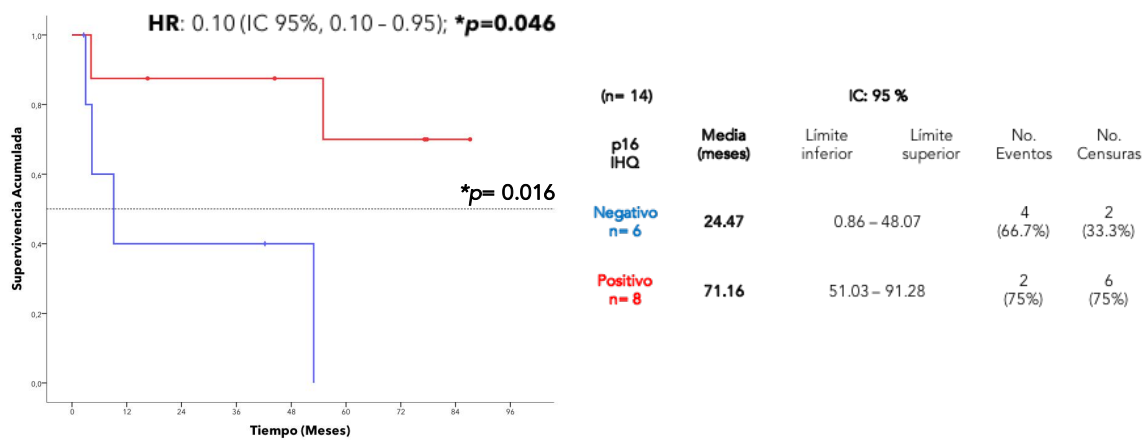
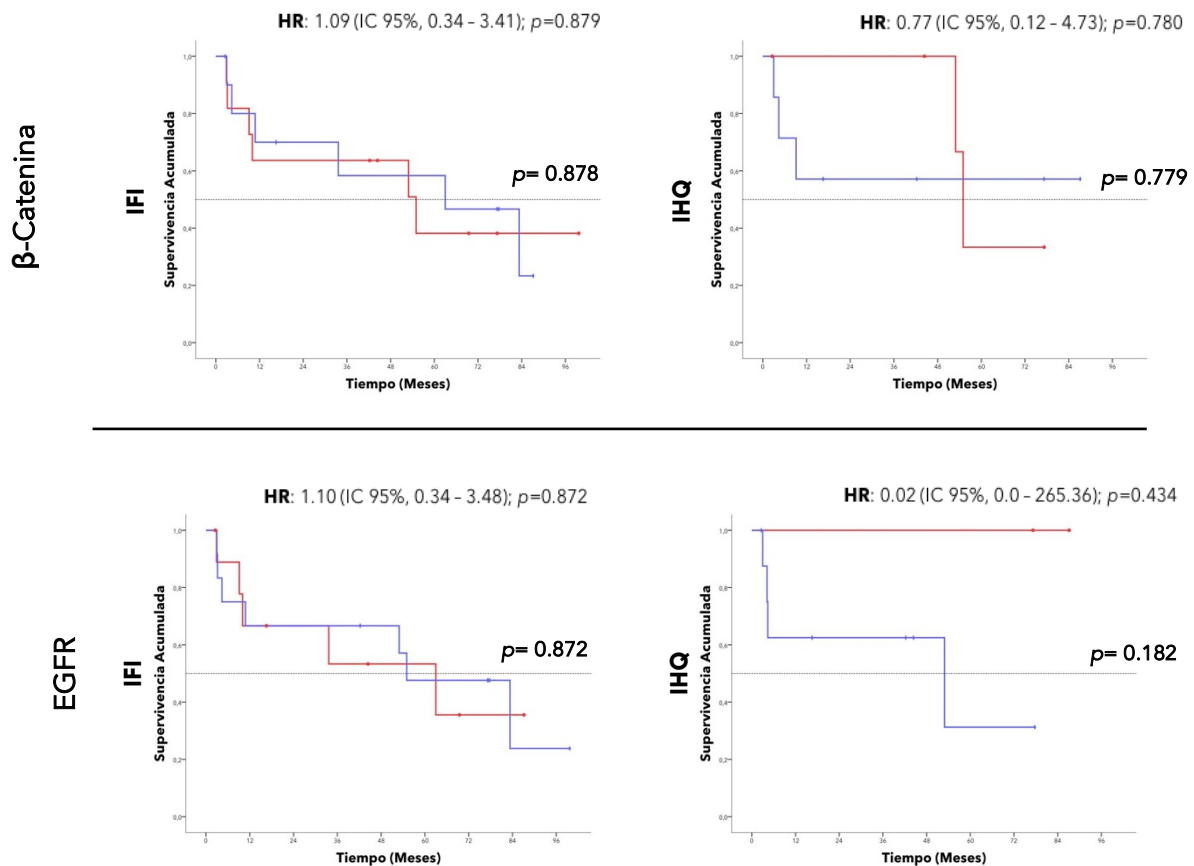


Figura 34. Curva de SLE y la expresión de p16.



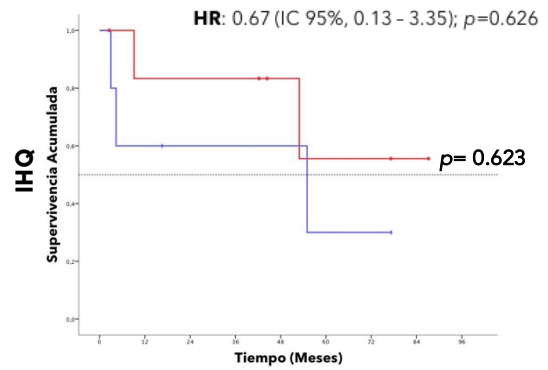
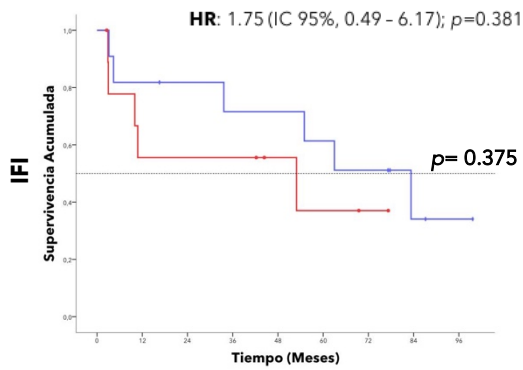
Adicionalmente, se estimó la SLE empleando los demás marcadores DNA/RNA Damage (IFI), CellRox (IFI), β -Catenina (IFI/IHQ), Caveolina 1 (IFI), Claudina 4 (IFI/IHQ) y EGFR (IFI/IHQ); sin embargo, ninguno de estos marcadores presentaron alguna diferencia estadísticamente significativa. De la misma manera fueron calculados sus respectivos HR, resultando que dichos marcadores no lograron impactar en la SLE (**Figura 35**).



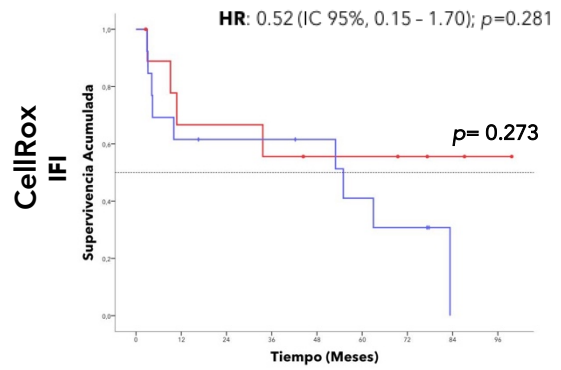
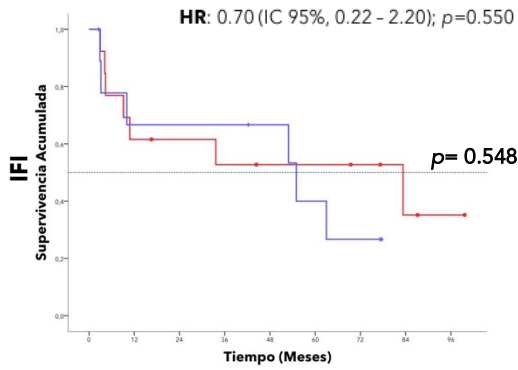
Continúa en la siguiente página.



Claudina 4



DNA/RNA Damage 4



Caveolina 1

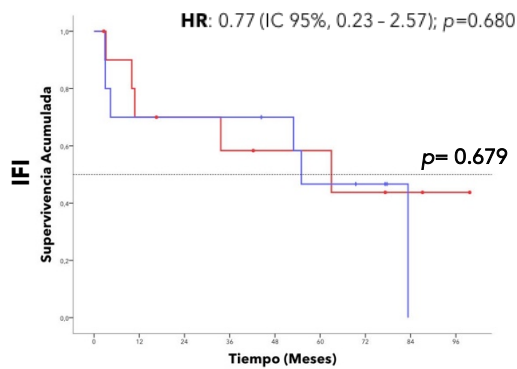


Figura 35. Curvas de SLE y la expresión de los diferentes marcadores propuestos.

Para cada marcador e independientemente de la técnica de inmunodetección en cada curva el color azul indica una baja expresión y el color rojo una alta expresión.



9. DISCUSIÓN

El CaOF es una neoplasia que ha presentado un incremento en su incidencia en los últimos años tanto a nivel mundial, no obstante, resulta importante analizar dicho comportamiento en nuestro país. Ha sido asociado meramente al estilo de vida, de modo que los factores etiológicos recaen en el consumo de alcohol y tabaco, así como la presencia del VPH. De manera importante, los casos VPH-positivos han sido asociados a un mejor pronóstico, pero aún no queda esclarecido si es debido a la temprana edad del diagnóstico o si el virus favorece algunos procesos que permitan dicho desenlace favorable. No obstante, dentro de este conjunto existen casos que no presentan una óptima respuesta al tratamiento, por ello surgió la necesidad de proponer un panel de proteínas con un valor pronóstico que permitiera entrever el comportamiento de dicha neoplasia y que en un futuro pudieran ser utilizado en la personalización del tratamiento.

Los reportes indican que el género masculino se ve mayormente afectado por esta neoplasia, donde se exhibe una relación incidente de 4:1 respecto al género femenino, de manera particular, los registros del INCan que contemplan entre el 2005 al 2017 son un reflejo de dicho comportamiento. En nuestra cohorte de estudio, se presentó el mismo fenómeno donde los hombres representaron un 83.6% en concordancia con lo reportado con la literatura (Castellsagué et al., 2004; Taberna et al., 2017). Sin embargo, en la cohorte analizada en este estudio, la media de edad indicó que los casos se presentan a edades tardías, y no hubo diferencias entre las edades de los pacientes VPH-positivos (56.08) y VPH-negativos (62.26 años) lo cual difiere con los reportes a nivel internacional (Solomon, et al., 2018). Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que nuestra población aun no presenta la transición epidemiológica hacia individuos jóvenes; sin embargo, tal como lo indica la línea de tendencia, los casos de CaOF se encuentran al alza, por lo que estos datos sientan el precedente para estudiar el comportamiento de esta enfermedad. Al mismo tiempo, los casos asociados al VPH también exhiben un comportamiento significativo que será visto tiempo después, esto pone de manifiesto la necesidad de nuevas estrategias preventivas entre la población.

Se ha demostrado con suficiente evidencia epidemiológica y biológica que el VPH es el agente causal de distintas neoplasias que afectan tanto a mujeres como hombres (Martel et



al., 2017). Por ello diversas investigaciones se han dado a la tarea de determinar la fracción atribuible, de manera particular, los reportes para CaOF presentan un comportamiento heterogéneo que va en relación con su distribución geográfica de modo que se ha establecido un rango que va del 20 al 70% (Tumban, 2019). Esto puede ser debido a los sistemas de detección, no obstante, en nuestra cohorte al haber empleado dos sistemas de detección molecular logramos determinar que la contribución del virus es de un 20.78 % lo cual va en relación con los reportes que se tiene para la región Central de América que exhiben una menor presencia viral (Anantharaman et al., 2017; Tumban, 2019).

A pesar de que en la actualidad no ha logrado ser definido un protocolo estándar para la detección de VPH en muestras de HNC, existen algunas metodologías para lograr dicho objetivo, un ejemplo es la detección de secuencias consenso como es el gen L1 compartido entre los distintos tipos virales (Venuti & Paolini, 2012). En el presente trabajo se emplearon los primers PGMY09/11 los cuales no lograron detectar de manera suficiente los casos VPH-positivos en esta cohorte, lo que deja de manifiesto la necesidad de implementar mejores condiciones para la detección del VPH. Por otra parte, la detección dirigida hacia el gen E6 mediante la detección múltiple empleada en este estudio permitió detectar más casos positivos, así como también lograr conocer la frecuencia de tipos virales; otro aspecto importante a considerar es que al hacer uso de esta herramienta y poder detectar a algunas de las oncoproteínas virales permite establecer que el evento neoplásico fue debido a una infección no productiva.

En el diagnóstico histopatológico es necesaria la conservación del tejido, ya sea por congelación o mediante la inclusión de muestras en parafina (Carlosama-Rosero, Gutiérrez, Rolón, & Rosero, 2014); sin embargo, una de las limitantes de utilizar la última metodología es que durante el proceso de inclusión se propicia la degradación del material genético impactando en la eficiencia de los procedimientos moleculares (Stanta, Bonin, & Utrera, 1998; Dugaard et al., 2015), para subsanar esta situación en nuestro proyecto y poder evaluar el efecto del VPH se empleó el marcador subrogado p16 directamente en el tejido donde la alta expresión de esta proteína, considerando una tinción fuerte y difusa en >70% del tejido, es un reflejo de la acción exacerbada de las oncoproteínas virales en función de mantener un fenotipo maligno, de tal suerte que, dicho marcador está contemplado en el



algoritmo de diagnóstico de la octava guía para la estadificación de HNC de la “American Joint Committee on Cancer” (AJCC). En el presente estudio se encontró concordancia respecto al empleo de p16 como predictor de la respuesta con lo reportado por Ang y colaboradores en 2010, a pesar de que se reportó una mediana de supervivencia de 3 años de un 82.4% considerando positiva la tinción de p16, particularmente en nuestro estudio encontramos que dicho parámetro se encontró disminuido a 11.92 meses, esto probablemente debido a que la mayoría de nuestros casos recabados fueron diagnosticados en estadios clínicos avanzados (EC IVA y IVB).

El cálculo del coeficiente Kappa de Cohen tiene como propósito establecer el de grado concordancia entre dos metodologías, sus valores van de 0 (pobre concordancia) a 1 (concordancia casi perfecta), Ang y colaboradores determinaron un coeficiente de 0.80 al utilizar la tinción de p16 y la detección de VPH; por nuestra parte, el cálculo de este coeficiente fue de 0.260 (concordancia aceptable), esta discrepancia puede deberse a que en dicha investigación la detección de VPH fue directamente en el tejido (hibridación *in situ*), mientras que en el presente estudio se realizó mediante la detección molecular, como fue mencionado anteriormente hay una alta probabilidad de que el material genético se haya encontrado degradado en los tejidos embebidos en parafina, no obstante, es importante el hecho de que es posible detectar al VPH en muestras de CaOF.

El porcentaje de respuesta a la terapia registrado en nuestro estudio fue del 58.2%, a pesar de esto, la recurrencia estuvo presente en un 23.63%, una proporción similar fue reportado en la investigación de Fakhry en el 2017, siendo este un 18.5% (Fakhry et al., 2017), de manera importante en la actualidad no existen reportes de marcadores pronóstico en relación con el evento de recurrencia en CaOF, por consiguiente, bajo nuestras condiciones se pudo establecer que la expresión de p16 se encuentra relacionada con la SLE, pudiéndose asociar con un retardo en la aparición de este evento en función a los pacientes que lograron tener una respuesta completa. Cabe mencionar que p16 ha sido empleado como marcador de predicción, dicho en otras palabras, se encuentra relacionada con la respuesta a un determinado tratamiento, por ello Harari y colaboradores en 2014 emplearon dicho marcador en un ensayo clínico aleatorizado (RTOG-0234) donde los pacientes reclutados habían sido sometidos previamente a una resección radical, posteriormente, se les administró una terapia combinada que consistía en quimio-



radioterapia (Cisplatino o Docetaxel) más Cetuximab, sus resultados lograron tener significancia estadística siendo que la positividad a p16 confirió un tiempo de SLE más prolongado siendo así un marcador importante en el seguimiento de la respuesta terapéutica (Harari et al., 2014). En nuestro estudio, proponemos el uso de p16 como marcador de respuesta a tratamiento independientemente del uso de Bevacizumab debido a que la mayoría de los pacientes no recibieron dicho medicamento.

Otro aspecto fundamental investigado en este proyecto fue el análisis de la expresión, en muestras de CaOF, de distintos marcadores relacionados a la resistencia de tratamiento o al desenlace clínico que han logrado ser asociados en otras neoplasias, a este respecto, Santoro y colaboradores en 2014 reportaron que una alta expresión de β -Catenina en tejidos de HNC mediante IHQ lograron asociarse a un pobre pronóstico, cabe recalcar que los tejidos analizados en dicho trabajo fueron en mayor proporción representados por tejido proveniente de la cavidad oral y únicamente 4 casos de orofaringe (Santoro et al., 2014), si bien en este trabajo analizando únicamente muestras provenientes de la región orofaríngea la expresión de dicho marcador vía IHQ no logró ser estadísticamente significativa para ser asociado con el desenlace clínico, en cambio, pudo notarse una tendencia clínica donde una alta expresión de β -Catenina logró verse disminuido el tiempo de SG .

La proteína Claudina 4 ha sido estudiada en otros tipos de cáncer donde se ha logrado evidenciar que su alta expresión en cáncer de ovario se asocia con una resistencia a tratamiento quimioterapéutico (Hegab et al., 2015) y así como también presentar un tiempo disminuido en SLE (Martín De La Fuente et al., 2018), en lo concerniente a nuestra investigación, Claudina 4 no ha sido evaluada en CaOF pero existen reportes como el de Melchers et al. 2013, donde se evaluó Claudina 7 en mayor proporción muestras de cáncer oral y un número de menor de neoplasias provenientes de la orofaringe, demostrando que la pérdida de su expresión en el centro tumoral podría ser utilizado como un marcador pronóstico de la recurrencia locoregional (Melchers et al., 2013). Por otra parte, en este trabajo Claudina 4 presentó un comportamiento heterogéneo en su expresión evaluándola mediante los dos sistemas de inmunodetección propuestos, lo cual no resultó de utilidad como marcador pronóstico en los diferentes casos de CaOF.



Respecto a EGFR, Sivarajah et al. 2019 reportó una asociación entre la alta expresión de EGFR total y tiempo reducido de SG de pacientes con CaOF, cabe mencionar que en nuestro trabajo a pesar de no ser significativo el estadístico de Kaplan-Meier para la técnica de fluorescencia, los casos que presentaron una alta expresión tuvieron menor un tiempo en la SG; en contraste, empleando la técnica de IHQ se presentó una asociación significativa respecto a un menor tiempo de SG y una alta expresión de dicho marcador (Sivarajah et al., 2019).

Por último, el marcador de daño a DNA/RNA tiene como blanco la detección de 8-oxoguanina (8-OHG) una base modificada resultado del estrés oxidante, este marcador fue investigado en 150 biopsias de cáncer de mama mediante el empleo de IHQ, se determinó que su baja expresión estuvo asociada a un pobre pronóstico (Sova, Jukkola-Vuorinen, Puistola, Kauppila, & Karihtala, 2010); por otro parte, al no existir reportes para CaOF nos dimos a la tarea de analizar su expresión mediante IFI encontrando que a pesar de no existir significancia estadística hay un marcado comportamiento clínico donde los casos que presentaron una alta expresión se vieron favorecidos en el tiempo de SG, dicho resultado puede ser atribuido al tamaño de muestra de nuestra investigación el cual fue limitado (54 casos) lo que pudo llevar a no encontrar diferencias estadísticas.

La técnica de referencia para el diagnóstico oncológico por mucho tiempo ha sido la IHQ, debido a lo accesible que es y a su poca complejidad. Sin embargo, las precipitaciones cromogénicas pueden dar pie a interpretaciones erróneas, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias basadas en fluorescencia garantizaría un rango dinámico más amplio; en otras palabras, la detección es más sensible permitiendo observar marcadores de menor concentración. Por otra parte, la detección múltiple también ratifica la optimización de tejidos, siendo que en uno solo se logran detectar varios marcadores. Otra bondad de estas nuevas estrategias de detección es la digitalización de toda muestra lo que conlleva a la evaluación del ambiente tumoral existente lo que abre la posibilidad de encontrar nuevas interacciones moleculares; no obstante, sería de gran interés complementar el presente proyecto con la patología digital, pues dicha herramienta permitiría una precisa cuantificación de la expresión de los marcadores propuestos empleando algoritmos



especializados que han sido analizados en otros tipos de cáncer. Así como determinar si existe impacto entre la localización del marcador y la SG y la SLE.

Mediante el cálculo de riesgos proporcionales de Cox, la mayoría de los marcadores evaluados en el presente trabajo no se encontraron asociados con el pronóstico de los pacientes con CaOF. Sin embargo, este trabajo sienta las bases para dar continuidad a la investigación de esta compleja neoplasia sin bien utilizando otros marcadores asociados a otros procesos o el procesamiento de otro tipo muestras con diferentes métodos de conservación.

10. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este proyecto, la expresión de las proteínas propuestas con potencial pronóstico no está asociada a la presencia viral. Esto puede ser parcialmente explicado debido a los estadios clínicos en los que se presentan los pacientes, asimismo, esta situación referente al EC es un aliciente para el desarrollo de nuevas estrategias de detección temprana.

La positividad al marcador p16 (IHQ) o la misma presencia viral lograron impactar una mayor SG, y aún más importante, que dicha expresión de la proteína p16 mediante IHQ logró ser un efectivo marcador de valor pronóstico asociado a SLE. Otro marcador que impactó en el desenlace de la cohorte analizada fue EGFR (IHQ) donde su alta expresión se asoció a un menor tiempo de SG, cuyos pacientes con una alta expresión de este marcador pudieran verse beneficiados con terapias anti-EGFR.



11. BIBLIOGRAFÍA

- Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Beachler, D. C., Gheit, T., Olshan, A. F., Wisniewski, K., ... D'Souza, G. (2017). Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 140(9), 1968–1975. <https://doi.org/10.1002/ijc.30608>
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., ... Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1), 24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
- Araldi, R. P., Sant'Ana, T. A., Módolo, D. G., de Melo, T. C., Spadacci-Morena, D. D., de Cassia Stocco, R., ... de Souza, E. B. (2018). The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(June), 1537–1556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., & Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer. *The Lancet*, 371(9625), 1695–1709. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2010.423>
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M. R., Marchetti, B., O'Brien, P. M., & Campo, M. S. (2005). E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *International Journal of Cancer*, 113(2), 276–283. <https://doi.org/10.1002/ijc.20558>
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., Vecchia, C. La, & Corrao, G. (2001). A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk, 85(July), 1700–1705.
- Boffetta, P., & Hashibe, M. (2006). Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 7, 149–156.
- Bravo, I. G., de Sanjosé, S., & Gottschling, M. (2010). The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in Microbiology*, 18(10), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.07.008>
- Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1–2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *Journal of Virology*, 79(5), 2839–2846. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005>
- Bugnon Valdano, M., Pim, D., & Banks, L. (2019). Choosing the right path: membrane trafficking and infectious entry of small DNA tumor viruses. *Current Opinion in Cell Biology*, 59, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.013>
- Cáncer, I. N. del. (2015). ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 20 de octubre de 2018, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es?redirect=true>
- Carlosama-Rosero, Y., Gutiérrez, N. R., Rolón, M. C., & Rosero, E. A. (2014). Biopsia por congelación: recomendaciones en la práctica clínica y dermatológica. *Revista Colombiana de Cancerología*, 18(2), 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2014.03.002>
- Castellsagué, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quirós, B., Tous, S., ... Xavier Bosch, F. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>
- Castellsagué, X., Quintana, M. J., Martínez, M. C., Nieto, A., Sánchez, M. J., Juan, A., ... Bosch, F. X. (2004). The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 108(5), 741–749. <https://doi.org/10.1002/ijc.11627>
- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., ... Gillison, M. L. (2013). Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 31(36), 4550–4559. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.3870>
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., ... Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 29(32), 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
- Chi, A. C., Day, T. A., & Neville, B. W. (2015). Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma — An Update. *Cancer J Clin*, 65, 401–421. <https://doi.org/10.3322/caac.21293>
- Chiou, C. C., Chang, P. Y., Chan, E. C., Wu, T. L., Tsao, K. C., & Wu, J. T. (2003). Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: Development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica Chimica Acta*, 334(1–2), 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00191-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00191-8)
- Chow, L. Q. M. (2020). Head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 60–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715>
- Cooke, M. (2010). The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. *Chromatographia*, 71(9), 977. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1556-3>
- Cottrill, E., Reilly, E., & Coblens, O. (2020). Trends in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Cancer*, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27881-6_1
- Cramer, J. D., Burtness, B., Le, Q. T., & Ferris, R. L. (2019). The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0227-z>
- Daugaard, I., Kjeldsen, T. E., Hager, H., Hansen, L. L., & Wojdacz, T. K. (2015). The influence of DNA degradation in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on locus-specific methylation assessment by MS-HRM. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(3), 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.007>
- De Martín Civetta, M. T., & Civetta, J. D. (2011). Carcinogénesis, 53(5), 405–414.
- de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice*



- and Research: *Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 47, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, 25(1), 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv>
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352(6338), 824–827. <https://doi.org/10.1038/352824a0>
- Doorbar, J., & Griffin, H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research*, 7(April), 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.005>
- Doorbar, J., Jenkins, D., Stoler, M. H., & Bergeron, C. (2020). *Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of PreCancer and Cancer*. Human Papillomavirus. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814457-2.00005-2>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30(SUPPL.5), F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Duvvuri, U., & Myers, J. N. (2009). Contemporary management of oropharyngeal cancer: anatomy and physiology of the oropharynx. *Current Problems in Surgery*, 46(2), 119–184. <https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2008.10.003>
- Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863–3890. <https://doi.org/10.3390/v7072802>
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., ... Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), 261–269. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn011>
- Fakhry, C., Westra, W. H., Wang, S. J., van Zante, A., Zhang, Y., Rettig, E., ... D'Souza, G. (2017). The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*, 123(9), 1566–1575. <https://doi.org/10.1002/cncr.30353>
- Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M. (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fossum, C. C., Chintakuntlawar, A. V., Price, D. L., & Garcia, J. J. (2017). Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology*, 70(7), 1021–1029. <https://doi.org/10.1111/his.13140>
- Fu, P., Chen, F., Pan, Q., Zhao, X., Zhao, C., Cho, W. C. S., & Chen, H. (2017). The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 10, 819–835. <https://doi.org/10.2147/OTT.S123912>
- Fuessel Haws, A. L., He, Q., Rady, P. L., Zhang, L., Grady, J., Hughes, T. K., ... Tying, S. K. (2004). Nested PCR with the PGM09/11 and GP5 +/6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods*, 122(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.007>
- Galbiatti, A. L. S., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D. S., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2013). Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 79(2), 239–247. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130041>
- Gallegos-Hernández, J. F. (2016). Cáncer de cabeza y cuello Head and neck cancer. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), 1–2.
- Gandhi, P., & Khare, R. (2017). A Unique Immunofluorescence Protocol to Detect Protein Expression in Vascular Tissues : Tacking a Long Standing Pathological Hitch. *Turkish Journal of Pathology*, (11), 57–65. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2017.01405>
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 122(1), 155–164. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- Gelwan, E., Malm, I. J., Khararjian, A., Fakhry, C., Bishop, J. A., & Westra, W. H. (2017). Nonuniform Distribution of High-risk Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinomas of the Oropharynx: Rethinking the Anatomic Boundaries of Oral and Oropharyngeal Carcinoma from an Oncologic HPV Perspective. *American Journal of Surgical Pathology*, 41(12), 1722–1728. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000929>
- Gerstenberger, W., Wrage, M., Kettunen, E., Pantel, K., Anttila, S., Steurer, S., & Wikman, H. (2018). Stromal Caveolin-1 and Caveolin-2 Expression in Primary Tumors and Lymph Node Metastases. *Analytical Cellular Pathology*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/8651790>
- Gheit, T. (2019). Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>
- Golusiński, P., Pazdrowski, J., Szewczyk, M., Misiólek, M., Pietruszewska, W., Klatka, J., ... Golusiński, W. (2017). Is immunohistochemical evaluation of p16 in oropharyngeal cancer enough to predict the HPV positivity? *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 22(3), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2017.01.003>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(1), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>



- Hanahan, D., Weinberg, R. A., & Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell*, 100, 57–70.
- Harari, P. M., Harris, J., Kies, M. S., Myers, J. N., Jordan, R. C., Gillison, M. L., ... Ang, K. (2014). Postoperative chemoradiotherapy and cetuximab for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck: Radiation Therapy Oncology Group RTOG-0234. *Journal of Clinical Oncology*, 32(23), 2486–2495. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.9163>
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 772, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., ... Boffetta, P. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777–789. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk179>
- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.-C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., ... Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(2), 541–550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>
- Hashim, D., Genden, E., Posner, M., Hashibe, M., & Boffetta, P. (2019). Head and neck cancer prevention: From primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of Oncology*, 30(5), 744–756. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz084>
- He, H., Zhao, Y., Wang, N., Zhang, L., & Wang, C. (2014). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts outcome of esophageal cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, 18(6), 326–328. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2014.08.008>
- Hegab, H. M., Malis, M. E. S., Mostafa, M. F., El-Saaba, B. M., El-agwany, A. S., & Tawfik, R. T. (2015). Claudin-4 in ovarian cancer and its relation to platinum compounds resistance. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 58(6), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.pog.2015.03.001>
- Hicks, D. A., Galimanis, C. E., Webb, P. G., Spillman, M. A., Behbakht, K., Neville, M. C., & Baumgartner, H. K. (2016). Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC Cancer*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2799-7>
- Hlatky, L., & Hahnfeldt, P. (2014). Beyond the cancer cell: Progression-level determinants highlight the multiscale nature of carcinogenesis risk. *Cancer Research*, 74(3), 659–664. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2508>
- Holmes, B. J., & Wenig, B. M. (2019). Annals of Diagnostic Pathology Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification, 38(October 2018), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.10.008>
- Holzinger, D., Schmitt, M., Dyckhoff, G., Benner, A., Pawlita, M., & Bosch, F. X. (2012). Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Research*, 72(19), 4993–5003. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3934>
- Howie, A. J. (1980). Scanning and transmission electron microscopy on the epithelium of human palatine tonsils. *The Journal of Pathology*, 130(2), 91–98. <https://doi.org/10.1002/path.1711300205>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010). Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 96, 3–1383.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Personal Habits and Indoor Combustions. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100E, 46–167.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jethwa, A. R., & Khariwala, S. S. (2017). Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(3), 411–423. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9689-6>
- Johnson, N. W., & Amarasinghe, H. K. (2016). Epidemiology and Aetiology of Head and Neck Cancers BT - Head and Neck Cancer: Multimodality Management. En J. Bernier (Ed.) (pp. 1–57). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27601-4_1
- Jung, H., Jun, K. H., Jung, J. H., Chin, H. M., & Park, W. B. (2011). The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *Journal of Surgical Research*, 167(2), e185–e191. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.02.010>
- Kawakita, D., & Matsuo, K. (2017). Alcohol and head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(3), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9690-0>
- Ketteler, J., & Klein, D. (2018). Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.31369>
- Kim, W., Lee, S., Seo, D., Kim, D., Kim, K., Kim, E. G., ... Youn, B. H. (2019). Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells*, 8(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells8091105>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., ... Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., ... Carey, T. E. (2008a). NIH Public Access. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 69(SensiGen LLC), 1–6.



- <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.7662.EGFR>
- Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., ... Carey, T. E. (2008b). Response to Therapy and Outcome in Oropharyngeal Cancer are Associated with Biomarkers Including HPV, EGFR, Gender and Smoking. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 69(19), 1–6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.7662.EGFR>
- Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., & Kzhyshkowska, J. (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncolimmunology*, 8(7). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1596004>
- Lee, S. H., Koo, B. S., Kim, J. M., Huang, S., Rho, Y. S., Bae, W. J., ... Lim, Y. C. (2014). Wnt/ β -catenin signalling maintains self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *Journal of Pathology*, 234(1), 99–107. <https://doi.org/10.1002/path.4383>
- Liang, C., Marsit, C. J., McClean, M. D., Nelson, H. H., Christensen, B. C., Haddad, R. I., ... Kelsey, K. T. (2012). Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 72(19), 5004–5013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3277>
- Liang, Y., Liu, Y., Wang, L., Yao, G., Li, X., Meng, X., ... Geng, J. (2018). Combined caveolin-1 and epidermal growth factor receptor expression as a prognostic marker for breast cancer. *Oncology Letters*, 9271–9282. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8533>
- Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., Brandwein, M. S., Ridge, J. A., Migliacci, J. C., ... Shah, J. P. (2017). Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 122–137. <https://doi.org/10.3322/caac.21389>
- Ma, L., Lin, K., Chang, G., Chen, Y., Yue, C., Guo, Q., ... Huang, S. (2018). Aberrant activation of β -catenin signaling drives glioma tumorigenesis via USP1-mediated stabilization of EZH2. *Cancer Research*. Recuperado de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2018/11/13/0008-5472.CAN-18-1304.abstract>
- Maglennon, G. A., McIntosh, P., & Doorbar, J. (2011). Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, 414(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.019>
- Mantilla, C., Mellado, I. S., Jaramillo, A. D., & Navas, M. C. (2015). Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis β -catenin signaling mechanisms and its role in carcinogenesis. *Enero -Junio*, 29(1), 109–128. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a10.pdf>
- Martel, C. De, Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type, 33(0), 664–670. <https://doi.org/10.1002/ijc.30716>
- Martín De La Fuente, L., Malander, S., Hartman, L., Jönsson, J. M., Ebbesson, A., Nilbert, M., ... Hedenfalk, I. (2018). Claudin-4 Expression is Associated with Survival in Ovarian Cancer but Not with Chemotherapy Response. *International Journal of Gynecological Pathology*, 37(2), 101–109. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000394>
- Martinez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., ... Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, 529(7587), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature16481>
- Masedunskas, A., Sramkova, M., Parente, L., & Weigert, R. (2013). *Cell Imaging Techniques. Methods in Molecular Biology* (Vol. 931). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-056-4>
- McBride, A. A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1–2), 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>
- Melchers, L. J., Bruine de Bruin, L., Schnell, U., Slagter-Menkema, L., Mastik, M. F., de Bock, G. H., ... Schuurin, E. (2013). Lack of claudin-7 is a strong predictor of regional recurrence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 49(10), 998–1005. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.07.008>
- Michaels, L. (1990). Palatine Tonsil and Oropharynx. *Atlas of Ear, Nose and Throat Pathology*, 73–81. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0727-0_10
- Mirkovic, J., Howitt, B. E., Roncarati, P., Demoulin, S., Suarez-Carmona, M., Hubert, P., ... Herfs, M. (2015). Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. *The Journal of Pathology*, 236(3), 265–271. <https://doi.org/10.1002/path.4533>
- Mizumoto, A., Ohashi, S., Hirohashi, K., Amanuma, Y., Matsuda, T., & Muto, M. (2017). Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1943. <https://doi.org/10.3390/ijms18091943>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews. Cancer*, 10(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Münger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, 89(2), 213–228. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00190-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00190-9)
- Mustafa, H. N., El Awdan, S. A., Hegazy, G. A., & Abdel Jaleel, G. A. (2015). Prophylactic role of coenzyme Q10 and *Cynara scolymus* L on doxorubicin-induced toxicity in rats: Biochemical and immunohistochemical study. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(6), 649–656. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.169588>
- Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsagué, X., Laporte, L., ... Trottier, H. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 15(12), 1319–1331. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70471-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70471-1)
- Neesse, A., Griesmann, H., Gress, T. M., & Michl, P. (2012). Claudin-4 as therapeutic target in cancer. *Archives of*



- Biochemistry and Biophysics*, 524(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.009>
- Nickson, C. M., Moori, P., Carter, R. J., Rubbi, C. P., & Parsons, J. L. (2017). Misregulation of DNA damage repair pathways in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma contributes to cellular radiosensitivity. *Oncotarget*, 8(18), 29963–29975. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16265>
- Ogden, G. R. (2005). Alcohol and oral cancer, 35(February), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.04.002>
- Ogra, P. (2000). Mucosal immune response in the ear, nose and throat. *The Pediatric infectious disease journal*, 19, S4–8. <https://doi.org/10.1097/00006454-200005001-00002>
- OMS. (2018). Cáncer. Recuperado el 20 de octubre de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Osborne, R. F., & Brown, J. J. (2004). Carcinoma of the oral pharynx: an analysis of subsite treatment heterogeneity. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 13(1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S1055-3207\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S1055-3207(03)00117-0)
- Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual Review of Pathology*, 4, 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>
- Parra-Medina, R., & Polo, J. F. (2017). Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(4), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.reper.2017.08.009>
- Pelekanou, V., Villarreal-espindola, F., Schalper, K. A., Puztai, L., & Rimm, D. L. (2018). CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers. *Breast Cancer Research*, 20(154), 1–10.
- Perry, M., & Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunology Today*, 19(9), 414–421. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01307-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01307-3)
- Polanska, H., Raudenska, M., Gumulec, J., Sztalmachova, M., Adam, V., Kizek, R., & Masarik, M. (2014). Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers E6. *Oral Oncology*, 50(3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.12.008>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Pöschl, G., & Seitz, H. K. (2004). REVIEW ALCOHOL AND CANCER, 39(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/alcac/agh057>
- Pour Khavari, A., Liu, Y., He, E., Skog, S., & Haghdoost, S. (2018). Serum 8-Oxo-dG as a Predictor of Sensitivity and Outcome of Radiotherapy and Chemotherapy of Upper Gastrointestinal Tumours. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 4153574. <https://doi.org/10.1155/2018/4153574>
- Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T. J., Meyer, F., Busch, C. J., Petersen, C., ... Kriegs, M. (2013). HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiotherapy and Oncology*, 107(2), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013>
- Ruddle, N., & Akirav, E. (2009). Secondary Lymphoid Organs: Responding to Genetic and Environmental Cues in Ontogeny and the Immune Response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183, 2205–2212. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804324>
- Sano, D., & Oridate, N. (2016). The molecular mechanism of human papillomavirus - induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, 21(5), 819–826. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-1005-x>
- Santoro, A., Pannone, G., Papagerakis, S., McGuff, H. S., Cafarelli, B., Lepore, S., ... Lo Muzio, L. (2014). Beta-catenin and epithelial tumors: A study based on 374 oropharyngeal cancers. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/948264>
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3), 495–505. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., ... Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schoenfeld, J. D. (2015). Immunity in Head and Neck Cancer. *Cancer Immunology Research*, 3(1), 12–17. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0205>
- Shang, S., Hua, F., & Hu, Z.-W. (2017). The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8(20), 33972–33989. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15687>
- Simard, E. P., Torre, L. A., & Jemal, A. (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncology*, 50(5), 387–403. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.016>
- Sivarajah, S., Kostjuk, M., Lindsay, C., Puttagunta, L., O'Connell, D. A., Harris, J., ... Biron, V. L. (2019). EGFR as a biomarker of smoking status and survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 48(1), 9–11. <https://doi.org/10.1186/s40463-018-0323-6>
- Soave, D. F. (2013). The Role of Human Papillomavirus in Pre-Cancerous Lesions and Oral Cancers. En M. R. N. Celes (Ed.) (p. Ch. 9). Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55943>




- Solomon, B., Young, R. J., & Rischin, D. (2018). Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Seminars in Cancer Biology*, 52(October 2017), 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.008>
- Sørensen, B. S., Busk, M., Horsman, M. R., Alsner, J. A. N., Overgaard, J., Kyle, A. H., & Minchinton, A. I. (2014). Effect of Radiation on Cell Proliferation and Tumor Hypoxia in HPV-positive Head and Neck Cancer In Vivo Models. *Anticancer Research*, 34(11), 6297–6304. Recuperado de <http://ar.iiarjournals.org/content/34/11/6297.abstract>
- Sorenson, R. L., & Clark Brelje, T. (2014). *Atlas of Human Histology: A Guide to Microscopic Structure of Cells, Tissues and Organs* (3rd ed.). Minnesota.
- Souza, L. R., Oliveira, M. V. M., Basile, J. R., Souza, L. N., Souza, A. C. R., Haikal, D. S., & De-Paula, A. M. B. (2015). Anatomical and Physiopathological Aspects of Oral Cavity and Oropharynx Components Related to Oropharyngeal Dysphagia. *Seminars in Dysphagia*, 3–40. <https://doi.org/10.5772/60766>
- Sova, H., Jukkola-Vuorinen, A., Puistola, U., Kauppila, S., & Karihtala, P. (2010). 8-Hydroxydeoxyguanosine: A new potential independent prognostic factor in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 102(6), 1018–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605565>
- Stanta, G., Bonin, S., & Utrera, R. (1998). RNA quantitative analysis from fixed and paraffin-embedded tissues. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 86, 113–119. <https://doi.org/10.1385/0-89603-494-1:113>
- Stedman, R. L. (1968). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Reviews*, 68(2), 153–207. <https://doi.org/10.1021/cr60252a002>
- Straight, S. W., Herman, B., & McCance, D. J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *Journal of Virology*, 69(5), 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.5.3185-3192.1995>
- Taberna, M., Mena, M., Pavón, M. A., Alemany, L., Gillison, M. L., & Mesía, R. (2017). Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology*, 28, 2386–2398. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx304>
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., & Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(2), 613–628. <https://doi.org/10.3390/ijerph8020613>
- Thomas, S., & Balan, A. (2012). Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene: An Overview. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 24, 30–35. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10011-1255>
- Tommasino, M. (2017). The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Research*, 231, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.013>
- Tumban, E. (2019). A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/v11100922>
- U.S. Department of Health and Human Services. (2004). *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General*. (Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Ed.) (Vol. 17). Atlanta, GA.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2010). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*.
- Van Monsjou, H. S., Wreesmann, V. B., Van Den Brekel, M. W. M., & Balm, A. J. M. (2013). Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncology*, 49(12), 1097–1102. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.001>
- Venuti, A., & Paolini, F. (2012). HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathology*, 6(SUPPL. 1), 63–74. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0372-5>
- Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1–2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.017>
- Wertz, P. W., & Squier, C. A. (1991). Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 8(3), 237–269. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/MED/1954652>
- Westra, W. H. (2012). The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head and Neck Pathology*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S48–S54. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0371-6>
- Westra, W. H., & Lewis, J. S. J. (2017). Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head and Neck Pathology*, 11(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s12105-017-0793-2>
- Wight, A. J., & Ogden, G. R. (1998). Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer. *Da review*, 34, 441–447.
- Wyss, A., Hashibe, M., Chuang, S.-C., Lee, Y.-C. A., Zhang, Z.-F., Yu, G.-P., ... Olshan, A. F. (2013). Cigarette, Cigar, and Pipe Smoking and the Risk of Head and Neck Cancers: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *American Journal of Epidemiology*, 178(5), 679–690. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt029>
- Zhou, C., & Parsons, J. L. (2020). The radiobiology of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Expert reviews in molecular medicine*, 22, e3. <https://doi.org/10.1017/erm.2020.4>
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a001883–a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>



12. ANEXOS

12.1 Aprobación de Comité Tutor

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD**

PMDCMOS/506/2018

C. Reyes Hernández Diego Octavio
PRESENTE

Por la presente se hace constar que usted ha sido aceptado para ingresar al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud en:


Maestría en Ciencias
Campo del Conocimiento de las
Investigación Clínica Experimental en Salud
Campo Disciplinario
Bioquímica Clínica


Con el protocolo de investigación titulado:
"Estudio de biomarcadores con valor pronóstico en carcinoma de orofaringe y su relación con el Virus del Papiloma Humano (VPH)"


Fungiendo como Tutora la:
Dra. Marcela Lizano Soberón
Co-tutor:
Dr. Joaquín Manzo Merino

La duración del Programa será del 6 de agosto de 2018 al 31 de julio de 2020.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. México, 05 junio de 2018.


Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
Coordinador del Programa





Unidad de Posgrado, Edificio "A" Primer Piso, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F., Tel.: 5623-7009
www.jmvertiz.posgrado.unam.mx



12.2 Aprobación por los Comités Científico y de Ética Institucionales

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cancerología



"2015 Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

No. Ref. INCAN/CI/486/15
INCAN/CEI/573/15

17' Septiembre del 2015

Dra. Marcela Lizano Soberón
Investigador Principal
Presente.

Comunicamos a usted que en la **Décima Primera Sesión Ordinaria del Comité de Investigación** y en la **Décima Primera Sesión Ordinaria del Comité de Ética en Investigación**, se presentó el Formato Único de Protocolo: "**Caracterización de mecanismos de resistencia a tratamiento en cáncer de cabeza y cuello y desarrollo de un panel de biomarcadores**", (015/039/IBI) (CEI/998/15), versión 2.0 de fecha 12 de Agosto del 2015, en español.

Los miembros del Comité de Investigación decidieron que los siguientes documentos revisados cumplen con los aspectos de confirmación de la calidad técnica y merito científico del protocolo.

- **Formato Único de Protocolo**, versión 2.0 de fecha 12 de Agosto del 2015, en español.
- **Carta de Consentimiento Informado (de estudio prospectivo)** versión 2.0 de fecha 12 de Agosto del 2015, en español.
- **Carta de Dispensa de Consentimiento Informado (de estudio retrospectivo)**

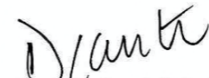
Los miembros de los mismos decidieron:

Aprobarlo

Esta aprobación tiene vigencia hasta el 16 de Septiembre del 2016, por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha. Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y la Dirección de Investigación de los avances de su proyecto, las presentaciones en congresos nacionales, así como sus publicaciones.

Atentamente


Dr. Luis A. Herrera Montalvo
Presidente del Comité de Investigación


Dr. David F. Cantú de León
Secretario Técnico del Comité de Investigación

LAHM/DFCL/asf

Av. San Fernando No. 22 Col. Sección XVI Tlalpan C. P. 14080 México, D. F. Tel. 56 28 04 00

www.incan.edu.mx

Página 1 de 1

20362



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cancerología



CEI: Dom. Av. San Fernando 2, Puerta 1
Col. Barrio del Niño Jesús,
Tlalpan, D.F. C.P. 14080

Comité de Ética en Investigación
Gestión 2013-2016
Registrado ante COFEPRIS 12 CEI 09 014 11
Registrado ante CONBIOÉTICA 09 CEI 016 2013 0424
Office For Human Research Protections (OHRP)
10RG0006100
IRB00007348
FWA00019235

"2015 Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Ref. INCAN/ Of. CEI 573/15
Ref. INCAN/ Of. CI 486/15
17 Septiembre 2015
CEI/998

Dra. Marcela Lizano Soberón
Investigador Principal
Presente

Estimada Dra: Lizano

Comunicamos a usted que en la **Décima Primera Sesión Ordinaria del Comité de Ética en Investigación**, y en la **Décima Primera Sesión Ordinaria del Comité de Investigación** se presentó el Formato Único de protocolo: **"Caracterización de mecanismos de resistencia a tratamiento en cáncer de cabeza y cuello y desarrollo de un panel de biomarcadores" (015/039/IBI)(CEI/998)**. Con los siguientes documentos:

- 1.-Formato Único de Protocolo, versión 2.0 en español de fecha 12 de Agosto del 2015.*
- 2.-Información y Consentimiento Informado para el Paciente que Participa en el Protocolo de Investigación, versión 2.0 en español de fecha 12 de Agosto del 2015.*
- 3.-Carta de Dispensa de Consentimiento Informado (estudio retrospectivo).*


Los miembros del comité decidieron que los documentos revisados cumplen con los aspectos de carácter ético, se describe el riesgo/beneficio del protocolo, así como la garantía y bienestar de los sujetos en el consentimiento Informado, por lo que decidieron:

"Aprobarlo"

Esta aprobación tiene vigencia hasta el 15 de Septiembre del 2016, por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha, junto con un informe de los resultados obtenidos. También será necesario informar al comité cualquier información derivada del estudio que deba ser informada a los participantes. Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y la Dirección de Investigación de los avances de su proyecto, las presentaciones en congresos nacionales, así como sus publicaciones. De acuerdo a los lineamientos de regulación internos, buenas prácticas clínicas y políticas de operación del Comité de Ética en Investigación del INCAN, es indispensable hacer de su conocimiento que cualquier miembro de los Comités que participa en un proyecto de investigación NO tiene VOZ ni VOTO en las resoluciones acerca del estudio. (Se requiere informar los avances "Status" de eventos adversos y enmiendas de manera semestral).

Atentamente


Dra. Myrna G. Candelaria Hernández
Presidente del Comité de Ética
en Investigación.
MGCH/NJCS*ser


Dr. Noel Jaime Castañeda Soto
Secretario Técnico

Av. San Fernando No. 22 Col. Sección XVI Tlalpan C. P. 14080 México, D. F. Tel. 56 28 04 00
www.incan.edu.mx

20362




12.3 Publicación de Artículos

- de la Cruz-López, K. G. et al. (2019) "Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches", *Frontiers in Oncology*, p. 1143. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.01143>
- Ayala-Díaz, S. et al. (2019) "Presence of Papillomavirus DNA sequences in the canine transmissible venereal tumor (CTVT).", *PeerJ*, 7, p. e7962. doi: 10.7717/peerj.7962. <https://peerj.com/articles/7962/>

12.4 Presentación de Trabajos en Congresos

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology
THE ARTURO FALASCHI CONFERENCE SERIES



Meetings and Courses 2019

Stazione Marittima Congress Centre - Trieste, ITALY


This is to certify that

Diego Octavio REYES HERNANDEZ
has attended the
**ICGEB DNA Tumour Virus Meeting
50th Anniversary**
9 - 14 July 2019 | Trieste-ITALY
His abstract titled
"HPV positive Head and Neck Cancers exhibit different mRNA profiles
associated to oxidative stress and oncogenic pathways"
was accepted for poster presentation

The Meeting consisted of 33 hours of lectures and poster sessions


The topics covered included:

- Replication
- Gene Expression
- Transformation
- Virions and Entry
- Virus-Host Interactions
- DNA Damage and Cell Growth
- Pathogenesis


Lawrence Banks
Director-General, ICGEB

Registered lectures are available on YouTube, iTunes and ICGEB Podcast at:
<http://www.icgeb.org/category/podcast/meeting-podcasts/>

Loc. Padriciano, 99 - 34149 Trieste, ITALY - Tel.: +39-040-3757333, Email: courses@icgeb.org
<https://www.icgeb.org/activities/meeting-and-courses/>



Certificate of Attendance



La Sociedad Mexicana de Virología y la Asociación Mexicana de Bioseguridad
otorgan la presente

CONSTANCIA

a REYES-HERNÁNDEZ, DIEGO OCTAVIO, Lara-Holguin, Ashlin N, Jimenez-Lima, Roberto, Cárdenas-Vallarta, Diana
Laura, Castro-Muñoz, Leonardo Josué, Morán-Torres, Adriana, Ramírez-Alcántara, Katia Montserrat, Lizano-Soberón,

Marcela & Manzo-Merino Joaquín

por su valiosa exposición del trabajo libre en CARTEL intitulado

Deregulated mRNAs Profiles from Head and Neck Cancers Are Associated to Oxidative Stress and Oncogenic

Pathways


presentado en el **XI CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA**

que tuvo lugar del 4 al 7 de septiembre de 2019 en los Espacios Magnos de la Universidad de Guanajuato.
Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México, a 7 de septiembre de 2019.


Dr. Ramón González García Conde
Presidente

Sociedad Mexicana de Virología AC
Folios: XICNV-C094




QFB Lissete Valenzuela Fabris
Presidenta
Asociación Mexicana de Bioseguridad AC