



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EGFR COMO BLANCO TERAPÉUTICO PARA EL
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

IVANA TLATELPA LÓPEZ

TUTORA: Mtra. LORENA CORREA ARZATE

No. 10
JCS

MÉXICO, Cd. Mx.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la vida por permitirme ser capaz de no abandonar mis metas, de darme la virtud de ser una persona inteligente que aunque hay veces que sentí que ya no podía más, siempre fui capaz de dar más y jamás rendirme porque el éxito no se basa en cuantas veces ganas sino en cuantas veces te levantas cuando fallas.

Gracias a mi papá Juan José que desde el lugar donde este, siempre está presente en mi corazón y que me enseñó a elegir lo que me hace feliz por eso él termina la carrera de Cirujana dentista junto conmigo.

Gracias a mi mamá Maribel que siempre ha estado cuando la he necesitado y siempre me acompaña en todas mis decisiones llenándome con su sabiduría y que gracias a ella estoy terminando una increíble experiencia en la cual no concluyo la carrera sola sino la terminamos juntas porque me ha enseñado a siempre salir adelante, es un ejemplo a seguir.

Gracias a mi abuelo Memo que de igual manera siempre me acompañó en cada paso y me apoyó en TODO lo que necesitaba, esta carrera también es de él.

Quiero agradecer también a Martín Velázquez que siempre me apoyó como si yo fuera un miembro de su familia y que gracias a su humanidad pude terminar mi carrera con éxito.

ÍNDICE

1. Resumen	iv
2. INTRODUCCIÓN	6
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	7
3.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	7
3.2 ETIOLOGÍA	8
3.2.1 Tabaco	8
3.2.2 Alcohol	9
3.2.3 VPH	9
3.2.4 Otros factores	10
3.3 CARCINOGENÉISIS	10
3.4 EPIDEMIOLOGÍA	13
3.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	15
3.6 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	16
3.7 CLASIFICACIÓN	19
3.8 DIAGNÓSTICO	21
3.9 TRATAMIENTOS	25
3.9.1 Cirugía, radiación y quimioterapia	25
3.9.2 Terapia dirigida (Targeted Therapy)	26
4. EGFR	27
4.1 EGFR y su papel en el cáncer	30
4.2 EGFR y su papel en el COCE	32
4.3 Terapia dirigida en EGFR	33
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
6. JUSTIFICACIÓN	36
7. HIPÓTESIS	36
8. OBJETIVOS	36
8.1 Objetivo general	36

8.2 Objetivos secundarios	36
9. METODOLOGÍA	37
9.1 Tipo de estudio	37
9.2 Población de estudio	37
9.3 Tamaño de muestra	37
9.4 Criterios de selección	37
9.4.1 Inclusión	37
9.4.2 Exclusión	37
9.4.3 Eliminación	37
9.5 Selección de muestras	38
9.6 Técnicas moleculares	38
9.6.1 Ensayo de inmunohistoquímica	38
10. RESULTADOS	40
10.1 Población de estudio	40
10.2 Análisis de inmunoexpresión	42
11. DISCUSIÓN	47
12. CONCLUSIONES	49
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa el tipo más común de malignidad en la cavidad oral. Entre los tratamientos de primera línea para el cáncer esta la quimioterapia, sin embargo, presenta poca especificidad y altos efectos secundarios, por ello, un nuevo enfoque podría ser la terapia dirigida debido a que presenta alta selectividad a las células cancerosas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) juega un papel clave en numerosos procesos que afectan el crecimiento tumoral, la progresión, la diferenciación, la invasión, la metástasis y la inhibición de la apoptosis.

OBJETIVO

Identificar la inmunexpresión de EGFR en el carcinoma oral de células escamosas.

METODOLOGÍA

Se observó la expresión de EGFR a través de la técnica de inmunohistoquímica en 3 muestras del Departamento de Patología y Medicina Bucal de la Facultad de Odontología de la UNAM.

RESULTADOS.

Se incluyeron 3 muestras de COCE del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Odontología para la técnica de inmunohistoquímica. A través del microscopio óptico se determinó la localización, el porcentaje de células positivas y la intensidad de EGFR en cada muestra.

CONCLUSIONES

La expresión de EGFR puede ayudar como marcador pronóstico en el COCE, sin embargo, sugerimos que se realicen estudios en un mayor número de muestras para identificar su comportamiento en este tumor.

2. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define el término *cáncer* como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. El cáncer supone un problema de salud a nivel mundial y es una de las causas más importantes de mortalidad. Las células cancerosas proliferan sin medida, ajenas al control de los organismos, por medio de mitosis repetidas y anómalas extendiéndose más allá de los límites normales e invadiendo partes adyacentes del cuerpo, propagándose a otros órganos. El cáncer es una enfermedad multifactorial, entre los factores que contribuyen a su desarrollo incluyen antecedentes genéticos y exposición crónica a diversos agentes ambientales. Todos estos factores conducen a la acumulación de cambios moleculares en las células, lo que contribuye al inicio de la carcinogénesis. La cirugía, la quimioterapia y la irradiación son los principales enfoques terapéuticos para el cáncer, siendo la quimioterapia un componente importante del tratamiento para los pacientes con cáncer. Sin embargo, su éxito es limitado debido a la falta de selectividad de las células tumorales sobre las células normales, lo que resulta en concentraciones insuficientes del fármaco en los tumores, toxicidad sistémica y la aparición de células tumorales resistentes a los fármacos. La terapia dirigida está ganando importancia debido a su especificidad hacia las células cancerosas, al tiempo que evita la toxicidad para las células fuera del objetivo, identificar los posibles blancos terapéuticos para el COCE es indispensable para el éxito de la misma. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es identificar la inmunoexpresión de EGFR en el carcinoma oral de células escamosas.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

El cáncer oral es un grave problema que está aumentando en prácticamente todo el mundo. Es más común en pacientes de 50 años en adelante y en muchos países es más frecuente en hombres que en mujeres, esto se debe a hábitos de riesgo o exposición al sol como parte algunas profesiones. El 90% de los tumores malignos primarios son Carcinomas Orales de Células Escamosas, siendo más frecuente en borde lateral de la lengua y su tratamiento dependerá del estadio en el que se encuentre la lesión.

3.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tumor maligno de origen epitelial más frecuente en la cavidad oral y supone del 2 al 3% de todas las neoplasias y más del 90% de los cánceres orales. La etiología del cáncer oral es multifactorial, siendo los factores de riesgo más importantes el consumo de tabaco y de alcohol, los cuales sinérgicamente aumentan el riesgo hasta en un 50%.⁽³⁾

El COCE puede aparecer en cualquier parte de la cavidad oral, siendo más frecuente en la lengua (Imagen 1. A y B) principalmente en los bordes laterales y superficie ventral, seguido del piso de la boca y menos frecuente en mucosa yugal, encía y paladar duro.⁽⁵⁾



Imagen 1. A y B. Carcinoma de células escamosas en borde de la lengua.⁽⁵⁾

3.2 ETIOLOGÍA

El cáncer oral es una enfermedad multifactorial donde la exposición constante a estímulos cancerígenos (químicos, físicos y virales) inducen a la mucosa oral condicionada genética y sistémicamente a presentar cáncer. Esto da como resultado una patogenia compleja ya que la presencia de los factores de riesgo por sí mismos no representan una sentencia de la presencia de la enfermedad.

Fumar es la causa más importante del cáncer oral, existe un aumento del riesgo dependiendo de la dosis, el consumo de alcohol combinado con el tabaquismo aumenta el riesgo, se menciona que es un riesgo 35 veces mayor de desarrollar cáncer. ^(1, 2, 3)

3.2.1 Tabaco

El tabaco consta de más de 5000 sustancias químicas distintas, las cuales han demostrado que muchas de ellas son carcinogénicas. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas y otras sustancias químicas del tabaco se activan metabólicamente con enzimas que promueven la excreción. Sin embargo se menciona que los metabolitos reactivos forman ductos en el ADN como el alcohol y que al no repararse adecuadamente provocan mutaciones y anomalías genéticas. ⁽¹⁾

También se habla de que el consumo de tabaco está asociado con la inflamación de los tejidos que se exponen y que producen citosinas, quimiocinas y factores del crecimiento que contribuyen a la proliferación, angiogénesis y por último a la carcinogénesis. ⁽¹⁾

El tabaco masticado que se usa en algunas poblaciones de Asia y el Pacífico también forma parte de los agentes etiológicos del cáncer oral. El efecto de los cigarrillos electrónicos sobre el riesgo de COCE sigue siendo desconocido y será evidente en los próximos años. ⁽¹⁾

3.2.2 Alcohol

Como se menciona anteriormente el alcohol en conjunto con el tabaco es un riesgo más elevado ya que el alcohol se metaboliza a acetaldehído el cual forma ductos de ADN e interfieren en su reparación, además de que puede servir como solvente para carcinógenos y así favorecer la exposición de células epiteliales a estas sustancias, otro mecanismo que puede conducir al COCE es la generación de metabolitos de oxígeno reactivos relacionados con el etanol. ^(1, 31)

Algunos autores mencionan que el etanol no ejerce por sí mismo un efecto carcinogénico; más bien es el acetaldehído que resulta un producto de la metabolización del etanol, el cual tiene propiedades cancerígenas. Por si solo el alcohol presenta mecanismos cáusticos, es decir que fomenta la disolución de los lípidos en las células del epitelio logrando una permeabilidad mayor en la mucosa, así como crea interferencias en la síntesis y reparación del ADN sobre las áreas de la mucosa oral y de las vías aerodigestivas superiores, provocando atrofia del epitelio. Lo que hace a la mucosa más susceptible a otros carcinógenos, permitiendo el pase de sustancias dañinas, como son los productos derivados de la combustión del tabaco. Sistémicamente causa xerostomía, afecta la capacidad del hígado para lidiar con compuestos tóxicos o potencialmente cancerígenos, y el alcoholismo crónico se asocia a la desnutrición y a un deterioro de la inmunidad innata y adquirida, terminando en una susceptibilidad mayor a infecciones y neoplasias. ⁽³¹⁾

3.2.3 VPH

Hablando de agentes infecciosos, las infecciones persistentes por VPH en particular el tipo 16 y en menor medida el VPH-18, entre otras cepas y VEB (virus de Epstein-Barr) son factores etiológicos en el cáncer orofaríngeo pero se observa una pequeña minoría (3%). ⁽¹⁾

3.2.4 Otros factores

El COCE también se asocia con la masticación de nuez de areca o betel-quid que es un término que se aplica a una variedad de mezclas personalizadas que comprenden nuez de areca (fuente de carcinógenos), hoja de betel (la hoja de Piper betle), lima apagada y/o tabaco, así como otras especias según las costumbres locales de India, Taiwán y algunas provincias de China. ^(1, 3, 4)

La exposición prolongada al sol es un factor de riesgo para el cáncer de labio. ^(1,3)

3.3 CARCINOGENESIS

La carcinogénesis oral es un proceso multifocal de alta complejidad que tiene lugar cuando el epitelio escamoso se ve afectado por diversas alteraciones genéticas. Cerca del 90% de los cánceres orales se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa oral, razón por la cual se denomina carcinoma oral de células escamosas (COCE), cuyos principales factores de riesgo incluyen el consumo de tabaco y alcohol. La carcinogénesis oral implica la acumulación de alteraciones genéticas discretas e irreversibles, así como cambios epigenéticos que conducen a una expresión/función alterada en proteínas, incluidas p53, NOTCH1, EGFR, CDKN2A, STAT3, ciclina D1, pRb y componentes de Wnt/ β -Catenina vía de la catenina, entre otras. El desarrollo de COCE se origina con la exposición a un carcinógeno que produce alteraciones genéticas y moleculares tempranas en los queratinocitos orales en todas las áreas de tejido expuestas al carcinógeno, seguida de displasia epitelial en diversos grados de evolución, para terminar con su transformación maligna a COCE y metástasis. (Imagen 2) ⁽¹⁹⁾

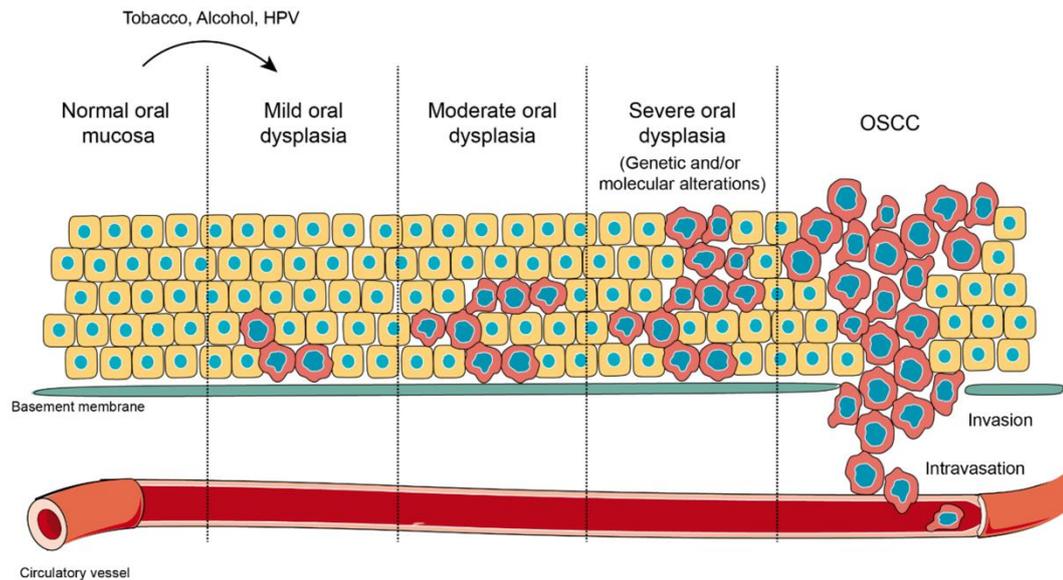


Imagen 2. Carcinogénesis oral ⁽¹⁹⁾

La mucosa oral normal es una capa estratificada de células epiteliales dispuestas sobre una membrana basal que separa las células epiteliales del tejido conectivo y los vasos sanguíneos. Cuando la mucosa oral se enfrenta a factores estresantes externos, como el tabaco, el alcohol o la infección por el virus del papiloma humano (VPH), las células de las capas más profundas sufren alteraciones morfológicas en forma y tamaño. Este novedoso estado representa una respuesta de adaptación frente a una estimulación dañina, lo que se conoce como displasia oral. La displasia bucal puede clasificarse en leve, moderada o grave, según la extensión de la lesión y la presencia de marcadores moleculares inducidos como resultado de la expresión genética alterada. La displasia oral se considera la etapa previa al carcinoma oral de células escamosas (COCE) y el predictor más fuerte de transformación maligna a cáncer. Durante el OSCC, los cambios fenotípicos masivos afectan a todas las capas epiteliales, y se extiende sobre el borde tisular, con roturas de la membrana basal, en un proceso que permite la invasión del tejido conectivo y la incorporación a los vasos sanguíneos (intravasación). ⁽¹⁹⁾

La división celular es un proceso el cual está controlado por dos mecanismos ya sea de estimulación o de inhibición y estos dependen de la normalidad de los tejidos y órganos. En esta división celular es importante que se cumplan dos eventos muy importantes para preservar la normalidad de la célula clon, el primer evento es la acción de los mecanismos reparadores que son productos de genes ubicados en distintos genes, que reparan los errores para que no sean heredados por las células hijas al dividirse la célula, y el otro evento es permitir que la apoptosis haga su trabajo eliminando las células con mutaciones, este proceso está regulado por P53 conocido también como “el guardián del genoma” y su contraparte bcl2 que es un gen anti-apoptótico. ⁽¹⁹⁾

Para que una célula normal cambie su fenotipo y se transforme a una célula neoplásica se requieren varias mutaciones en varios genes y esto ocurre a través de varios años de estar expuesto a un agente carcinogénico. ⁽¹⁹⁾

Todo inicia por una sola célula que evadió los procesos para controlar los daños genéticos y comienza a dividirse con esas mismas mutaciones y daños pero a su vez puede causar los mismos daños a las células a su alrededor. ⁽¹⁹⁾

La carcinogénesis consta de tres etapas iniciación, promoción y progresión en donde la iniciación se presenta a nivel del genoma con todas las mutaciones y daños genéticos, la promoción representa la etapa donde hay crecimiento tisular, es decir formación del tumor donde participan los factores de crecimiento, angiogénesis y degradación de matrices celulares y por último en la progresión en donde existe la capacidad de invadir a tejidos adyacentes o a distancia por parte de la célula maligna. (Imagen 3) ⁽¹⁹⁾

Chemical Carcinogenesis

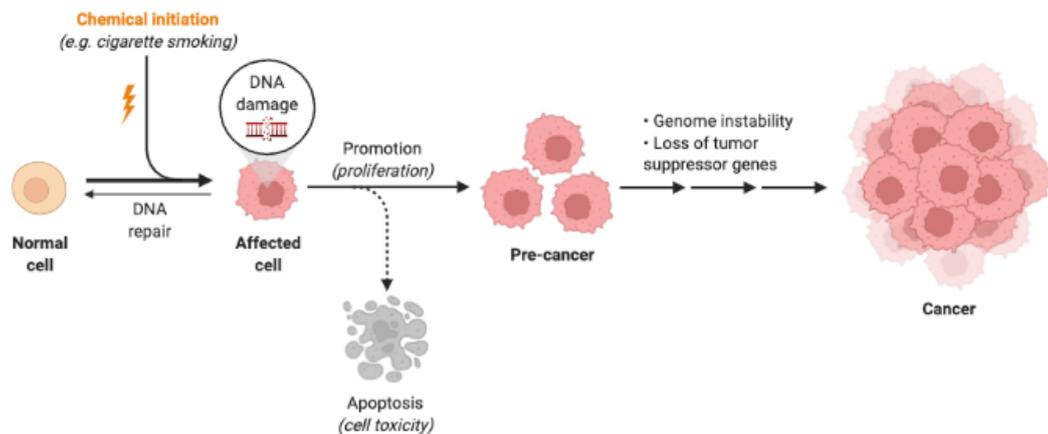


Imagen 3 -. Carcinogénesis química. ⁽¹⁹⁾

3. 4 EPIDEMIOLOGÍA

Dado que el COCE representa más del 90% de todas las neoplasias malignas orales y alrededor del 15% de los carcinomas de células escamosas de todo el cuerpo, el grupo de carcinomas presenta un problema de salud grave y mundial, con una prevalencia máxima en el sudeste asiático. ^(1, 2) Es el sexto cáncer más común en todo el mundo (cuando se incluyen los sitios orofaríngeos), la incidencia sigue aumentando y se prevé que aumente un 30% (1,08 millones de casos nuevos al año) para el 2030. ⁽¹⁾

En todo el mundo la incidencia de cáncer oral es mayor en hombres (5,5 casos por 100 000 habitantes por año) que en mujeres (2,5 casos por 100 000 habitantes por año), pero en los últimos años en algunos países como India y Tailandia donde las proporciones entre hombres y mujeres son 12 y 11,56 respectivamente. ⁽³⁾

Es más frecuente en la quinta y sexta década de vida, ocurren en pacientes de 50 a 70 años. A medida que disminuye las tasas de tabaquismo, la incidencia de cáncer intraoral disminuye, aunque en algunos países se han informado aumento en pacientes más jóvenes. ^(3, 4)

En los registros del Instituto Nacional de Cancerología de México, en 10 años (1985-1994) se reportaron 28,581 casos con confirmación histológica de cáncer, de los cuales 8984 (31.4%) casos fueron en hombres y 19,597 (68.6%) casos fueron en mujeres. En los hombres, de 1985 a 1989, la prevalencia de cáncer de la cavidad oral (excluyendo las glándulas salivales mayores) fue de 5.4% (232 pacientes); de 1990 a 1994, 266 pacientes (5.6%) y en el total del periodo de 1989 a 1994 se reportaron 415 pacientes (4.6%). En las mujeres, de 1990 a 1994, la prevalencia de cáncer de la cavidad oral (excluyendo las glándulas salivales mayores) fue de 1.3% (n=125) de 1990 a 1994, 140 pacientes (1.3%) y en el total del periodo de 1989 a 1994 se reportaron 265 pacientes (1.3%).

Un estudio que se realizó en el Hospital General de la Ciudad de México de 1990 hasta 2008 donde se registraron un total de 531 pacientes diagnosticados con COCE en donde la edad media fue de $62,5 \pm 14,9$ con un rango de edad de 16 a 98 años, donde los pacientes con menos de 40 años fueron el 11,6% (62 pacientes) y mayores de 40 años fueron el 88,3% (469 pacientes) y en donde el 58,4% (325 pacientes) eran hombres y el 41,6% eran mujeres (221 pacientes) lo que se concluyó como una relación hombre:mujer de 1,4:1, a su vez también se menciona que la zona anatómica donde el COCE prevalece fue la lengua con 44,7% (237 casos), enseguida fue el labio con 21,2% (113 casos) posteriormente las encías con 20,5% (109 casos), piso de boca con porcentaje de 8,9 (47 casos), paladar con el 0,5% (3 casos) y por último otros sitios de la boca con 4,2% (22 casos). ⁽²⁴⁾

En otro estudio que se realizó en el archivo de Anatomía Patológica del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” de un periodo de 1997 hasta 2001 se analizaron 149 casos de pacientes diagnosticados con COCE donde el objetivo era el género de prevalencia, zona anatómica, y grado de diferenciación, entre otros. Se obtuvo un resultado donde el 33 de los casos (67,3%) eran de género masculino y 16 de los casos (32,7%) eran de género femenino, por lo que la relación hombre:mujer fue de 2:1, las zonas donde se presentó el COCE fue en mucosa de carrillo con 4 casos (8,2%), encía con 7 casos (14,30%), seguido de labios con 9 casos (18,4%), lengua con 15 casos (30,6%), paladar con 6 casos (12,2%), trígono retromolar con 4 casos (8,2%), piso de boca con 4 casos (8,2%); por lo que se dedujo que la lengua fue la localización más frecuente, también se mencionó que la edad media del COCE en esta revisión fue de 68 años de edad con una desviación estándar de 14,8 años, el rango de edad era de 32 años a 94.⁽²⁵⁾

3.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La presentación clínica es variable, en un inicio asintomática y precedida por cambios de color en la mucosa, siendo la eritroplasia, leucoplasia o la combinación de ambas las lesiones más importantes, también se puede presentar como una erosión, una úlcera pequeña o una masa exofítica de textura granular o verrugosa.

El cáncer oral puede afectar cualquier sitio o área de la mucosa oral, el COCE surge del epitelio mucoso de la cavidad oral los cuales los principales sitios son: labios, paladar duro y blando, lengua, piso de boca y trígono retromolar. ^(1, 2) El COCE tiene mayor predilección en labio inferior (principalmente bermellón), bordes laterales de la lengua posteriores, puede abarcar vientre y dorso de la lengua y piso de boca, seguido de la encía insertada y trígono retromolar. La presentación puede verse como cambios en el color de la mucosa, ya sea de color blanco, rojo

o mixtos pueden presentar cambios nodulares y con presencia de úlcera generalmente con forma irregular y bordes indurados, una característica imprescindible de la úlcera es que no cicatriza y por lo regular no presenta dolor. ^(2, 4) Generalmente el COCE se diagnostica de forma tardía o en etapas avanzadas ya que los pacientes toman acción porque interfieren en las funciones fundamentales como comer y hablar y es importante recalcar que la mayoría de los pacientes diagnosticados con COCE no presentan ninguna lesión pre maligna previa. ⁽¹⁾ El COCE comúnmente se presenta como una lesión única que se presenta en una variedad de formas que persiste por más de 3 semanas. ⁽⁴⁾

El COCE también puede afectar el labio en un 30 % pero se ha demostrado que es una enfermedad distinta al COCE, el cáncer de labio puede seguir a una queilitis actínica crónica en consecuencia de la radiación solar, afecta principalmente el bermellón del labio inferior y tiene mejor pronóstico que el COCE. ⁽⁴⁾

3. 6 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Para comprender de mejor manera la aparición del COCE es importante resaltar las lesiones potencialmente malignas las cuales son entidades que se asocian a alteraciones en la homeostasis del epitelio bucal que la mayoría de las veces se transforman a su forma maligna. Dentro de las más comunes se encuentra la leucoplasia oral y la eritroplasia. ⁽²⁰⁾ Estas lesiones en el mayor de los casos preceden a la aparición de cánceres invasivos de la cavidad oral, que cuando se diagnostican tempranamente y la intervención es adecuada el riesgo de transformación a COCE disminuye. ⁽²³⁾

En la literatura mencionan distintas entidades consideradas lesiones potencialmente malignas como lo son: la leucoplasia, eritroplasia, fibrosis submucosa, liquen plano oral, reacciones liquenoides, queilitis actínica, hiperplasia, entre otras, la mayoría de estas lesiones al inicio son asintomáticas. ⁽²³⁾

La leucoplasia según la OMS es una mancha o placa predominantemente blanca que no se desprende, que no corresponde a ninguna otra entidad tanto clínica como histológicamente y tiene tendencia a la transformación maligna. ⁽²¹⁾ La leucoplasia presenta distintos aspectos histológicos que podría ser desde una hiperqueratosis (aumento del estrato córneo) sin displasia hasta una displasia severa con hiperplasia epitelial. ⁽²¹⁾

En la leucoplasia generalmente hay presencia de displasia ya sea leve, moderada o severa en donde la leve sólo presenta cambios en los estratos inferiores del epitelio, en la displasia moderada existe en los dos tercios inferiores al epitelio y en la severa se encuentra en más de dos tercios del epitelio. ⁽²¹⁾ La leucoplasia (Imagen 4. A y B) es la lesión potencialmente maligna con más asociación con el COCE, esta entidad presenta cambios histológicos y citológicos observados en el carcinoma in situ. ⁽²¹⁾



Imagen 4. A y B Leucoplasia. ⁽²¹⁾

Por otro lado está la eritroplasia, otra alteración de la mucosa con gran porcentaje de transformación maligna y se define como una mancha predominantemente roja que puede presentar una superficie granular que no se identifica clínicamente e histológicamente como otra entidad roja, de causas traumáticas, o inflamatorias. ⁽²⁰⁾ En estudios epidemiológicos reporta máculas rojas con varias semanas de evolución que el 51% se diagnostican como eritroplasias las cuales corresponden a carcinomas invasivos, el 40% representó carcinoma *in situ* y el 9 % representó moderados cambios malignos. ^(20, 22) La eritroplasia (Imagen 5. A y B) aunque no es una entidad tan común como la leucoplasia tiene mucho mayor riesgo de transformación maligna porque en su mayoría presentan displasia donde albergan carcinomas *in situ* e incluso COCE. ⁽²²⁾



Imagen 5. A y B. Eritroplasia. ⁽²²⁾

Otra entidad es la leucoeritroplasia que se utiliza como un sinónimo de la leucoplasia y la eritroplasia ya que está presenta estas dos lesiones, además de que se le asigna el nombre de la lesión que se presente en gran porcentaje, es decir, leucoeritroplasia la lesión dominante es la leucoplasia y eritroleucoplasia la lesión dominante es la eritroplasia. ⁽²²⁾

El COCE se origina del epitelio de la mucosa oral que recubre la cavidad oral, existe un proceso de progresión histológica (Imagen 6) ordenada donde en primer lugar se presenta una hiperplasia de células epiteliales de la mucosa enseguida una displasia que comúnmente es severa que causa un carcinoma *in situ* y finalmente el carcinoma invasivo. ⁽¹⁾

Se puede observar que los genes específicos se van enriqueciendo en cada etapa de progresión del carcinoma y a diferencia de otros cánceres en los que las mutaciones oncogénicas conducen a tumorigénesis, en el COCE implica la inactivación de genes supresores de tumores como CDKN2A y TP53 en etapas tempranas y PTEN (codificantes de fosfatasa y tensin homólogo) en etapas posteriores. ⁽¹⁾

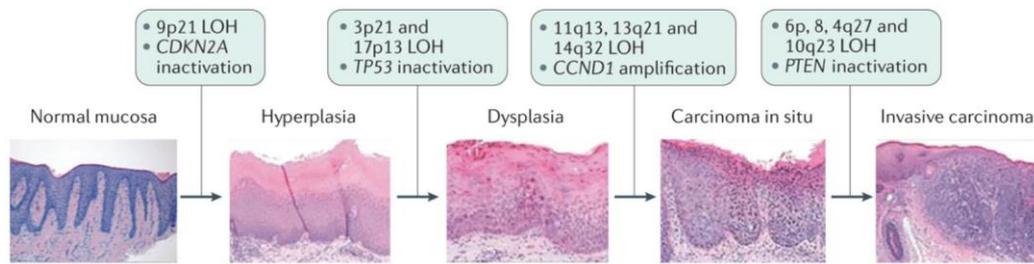


Imagen 6. Carcinogénesis. ⁽¹⁾

Según el estadio que se encuentre el cáncer, las células presentan hiperchromasia, pleomorfismo e incremento del índice entre el núcleo y citoplasma, queratinización temprana y formación de masas esféricas de queratina llamadas perlas de queratina, además de que infiltra tejidos adyacentes formando cordones e islotes. La mayoría de los cánceres en la cavidad oral y la lengua son moderados o bien diferenciados, por lo que el COCE pobremente diferenciado es menos frecuente. ^(3, 4)

3. 7 CLASIFICACIÓN

El Carcinoma oral de células escamosas se clasifica en tres grados (Tabla 1), a mayor diferenciación el carcinoma tiene mejor pronóstico:

Tabla 1. Tabla de diferenciación del COCE. ^(4,6)

Bien diferenciado

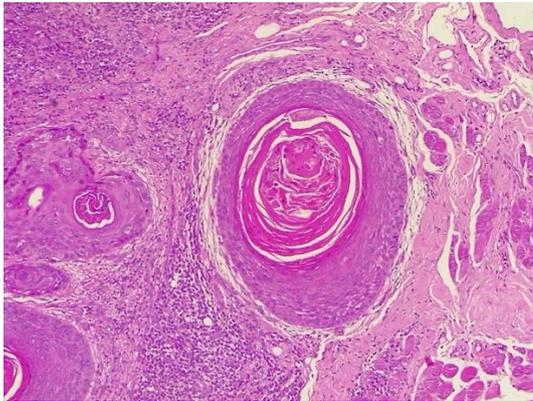


Imagen 7. ⁽³¹⁾

Clavos epiteliales que invaden la lámina propia con perlas de queratina, presencia de cohesión celular, raras mitosis atípicas, reducido pleomorfismo celular y nuclear, raras células gigantes multinucleadas, menos de dos mitosis por campo. ^(4, 6)

Moderadamente diferenciado

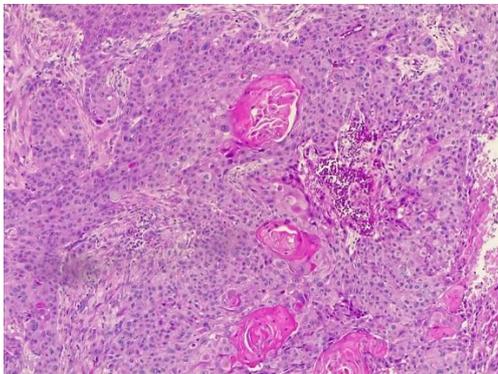


Imagen 8. ⁽³²⁾

Clavos epiteliales invasores irregulares, pérdida de cohesión celular, algunas mitosis atípicas, pocas células gigantes multinucleadas, 2 o 4 mitosis por campo. ^(4, 6)

Pobrementemente diferenciado

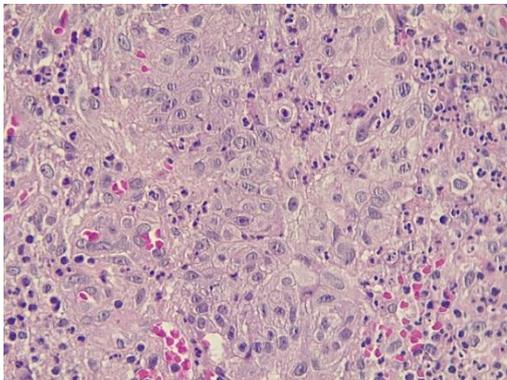


Imagen 9. ⁽³²⁾

Lámina del epitelio invasor sin arquitectura evidente, anomalías celulares graves como pleomorfismo e hiperchromatismo, descohesión celular, frecuentes mitosis atípicas, frecuentes células gigantes multinucleadas, más de 4 mitosis por campo. ^(4, 6)

3.8 DIAGNÓSTICO

Los tumores intraorales son diagnosticados mediante estudio histopatológico, el metanálisis muestra que las pruebas complementarias no pueden reemplazar la biopsia y el estudio histopatológico. Se menciona que cuando ya existe metástasis en ganglios linfáticos la técnica BAAF (Biopsia por aspiración con aguja fina) es la ideal para realizar ese diagnóstico. ⁽¹⁾

La biopsia incisional es la adecuada para el diagnóstico del COCE ya que en una biopsia excisional en caso de ser una lesión maligna como es el COCE es necesario eliminar un margen de tejido sano de por lo menos 1 cm. ⁽⁴⁾

Algunos auxiliares de diagnóstico del COCE son: ⁽¹⁾

- Tinciones como Azul de Toudina donde se pueden observar células con mayor acción metabólica. ⁽¹⁵⁾
- Detección basados en luz los cuales observa la reflectancia y absorbancia de los tejidos en la luz donde muestran cambios estructurales y metabólicos. ⁽¹⁵⁾
- Radiografía puede ser una ortopantomografía o Tomografía computarizada que nos muestra la invasión a hueso.
- Radiografía de Tórax o TC que nos muestra invasión a pulmones, ganglios linfáticos hiliares, costillas o vértebras.
- Resonancia magnética del sitio del tumor primario, de la cabeza y cuello para observar metástasis a ganglios.
- PET/TC para un diagnóstico temprano y una estadificación precisa.
- Ecografía y BAAF (Biopsia por aspiración de aguja fina) en ganglios linfáticos.

El diagnóstico temprano del COCE es muy importante ya que el pronóstico es mejor en carcinomas tempranos además de que el tratamiento puede resultar menos invasivo. ⁽⁴⁾

El diagnóstico del COCE se puede hacer sobre la base del estudio histopatológico de rutina con tinción hematoxilina y eosina. Sin embargo, para tumores pobremente diferenciados puede ser necesaria la inmunohistoquímica para confirmar un origen epitelial. ⁽¹⁾

La prueba de VPH es obligatoria para todos los tumores primarios orofaríngeos ya que es un determinante importante para la estadificación y pronóstico. ⁽¹⁾

Posteriormente de la confirmación histopatológica del COCE, la evaluación de estadificación incluye procedimientos como: ⁽¹⁾

- Examen de cabeza y cuello con inspección directa de la cavidad oral y nasofaringolaringoscopia con fibra óptica.
- Imágenes transversales de cabeza y cuello por TC para establecer la extensión de la enfermedad locorregional.
- TC de tórax para descartar metástasis a distancia.

El COCE además de todas las neoplasias malignas deben de tener una estadificación según la clasificación TNM de la Organización Mundial de la Salud en donde T es el tamaño del tumor (Tabla 2), N es metástasis a linfonodos (Tabla 3) y M es metástasis a distancia (Tabla 4), es importante esta clasificación porque así podremos saber tanto el tratamiento para el paciente como el pronóstico. ⁽⁴⁾

Tablas de TNM de cáncer de cabeza y cuello. ⁽⁷⁾

TX	No se puede evaluar el tumor primario o hubo cáncer, se eliminó pero hubo recidiva.
Tis	Describe un estadio llamado carcinoma in situ. Este tumor es un cáncer muy incipiente en el que las células cancerosas se detectan en sólo una capa de tejido.
T1	El tumor mide 2 cm o menos en su mayor dimensión. El tumor ha invadido los tejidos circundantes hasta una profundidad de 5 mm o menos: Se denomina profundidad a la invasión.
T2	El tumor mide 2 cm o menos y la profundidad está entre 5-10 mm o el tumor mide más de 2 cm pero menos de 4 cm y la profundidad de la invasión es de 10 mm o menos.
T3	El tumor mide más de 4 cm o es algún tumor con una profundidad de invasión mayor a 10 mm.
T4	Esta es una enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada.
T4a (labio)	El tumor se originó en el labio, pero ha invadido el hueso o se ha diseminado al nervio alveolar inferior de la boca, el piso de boca o la piel de la cara.
T4a (cavidad oral)	El tumor ha invadido las estructuras cercanas de la boca, como la mandíbula, los senos nasales o la piel de la cara
T4b	El tumor ha invadido los músculos y los huesos que forman la boca o la base del cráneo y/o recubre arterias internas.

Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay evidencia de cáncer en los ganglios linfáticos regionales
N1	El cáncer se ha diseminado a un sólo ganglio linfático del mismo lado que el tumor primario y el cáncer detectado en el ganglio mide 3 cm o menos.
N2a	El cáncer se ha diseminado a un sólo ganglio linfático del mismo lado que el tumor primario y mide más de 3 cm, pero menos de 6 cm. No hay ENE (Extensión extranodal).
N2b	El cáncer se ha diseminado a más de 1 ganglio linfático del mismo lado que el tumor primario y ninguno mide más de 6 cm. No hay ENE
N2c	El cáncer se ha diseminado a más de 1 ganglio linfático en cualquiera de los dos lados del cuerpo y ninguno mide más de 6 cm. No hay ENE

N3a	El cáncer detectado en los ganglios linfáticos mide más de 6 cm. No hay ENE
N3b	Hay ENE en un ganglio linfático.

Tabla 4. M- METÁSTASIS.⁽⁷⁾

M0	El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
M1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Para conocer la probabilidad de supervivencia de los pacientes con COCE es necesaria saber la etapa en la que se encuentra el cáncer y se asigna según el estadio tumoral que presente el paciente gracias a las características de la lesión, a continuación se muestran los estadios reportados por la OMS. ⁽⁵⁾

Estadio 0 - Tis- M0- N0.

Estadio I - T1- M0- N0.

Estadio II - T2- M0- N0.

Estadio III- T1-2 N1- M0, T3- N0-1 M0.

Estadio IVA- T1-3 N2- M0, T4a- N0-2 M0.

Estadio IVB- Cualquier T, N3- M0, T4b- cualquier N, M0.

Estadio IVC- Cualquier T, Cualquier N, M1.

Se considera un estadio I y II cuando el cáncer está en un periodo inicial, donde la tasa de supervivencia es alta, en cambio, el pronóstico es más grave en los estadios III y IV ya que afecta la calidad de vida del paciente en cuanto a las funciones elementales (fonación, alimentación e higiene) y por lo tanto es un pronóstico malo. ⁽⁵⁾

3.9 TRATAMIENTOS

El enfoque del tratamiento para cada paciente se basa en el sitio anatómico, el estadio, las características de la enfermedad, las consideraciones funcionales y los deseos del paciente. Es importante la comunicación con el paciente sobre todo la comunicación en cuanto a dar una noticia sobre diagnóstico de cáncer, el paciente debe tener en cuenta varios aspectos como son: los resultados previstos, el pronóstico, toda la información sobre la enfermedad, reacciones psicológicas del paciente y los posibles efectos adversos del tratamiento. ^(1,4)

3.9.1 Cirugía, radiación y quimioterapia

Los principales tratamientos para los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello son la resección, la radiación y la terapia sistémica. El tratamiento debe ir a un enfoque lo más altamente curativo optimizando la preservación de la función. Los pacientes en los que el cáncer primario es pequeño y sin compromiso de ganglios o sólo un ganglio afectado, tiene una tasa de hasta el 80% de curación utilizando una modalidad única ya sea resección o radiación. En el caso del COCE la cirugía es la más utilizada junto con la radioterapia. ^(1, 4)

Las ventajas de la cirugía son:

- Escisión completa del tumor y de los ganglios linfáticos.
- Resección del hueso afectado.
- Se usa para tumores radiorresistentes.

Las desventajas de la cirugía principalmente son que es un tratamiento muy agresivo que puede afectar considerablemente la calidad de vida del paciente, además que puede utilizarse al mismo tiempo con radio y quimioterapia que conlleva a presentar más efectos secundarios. ⁽⁴⁾

Los avances en la resección mínimamente invasiva, que incluyen la resección transoral robótica o con láser han tenido una mayor expectativa en la calidad de vida en cuanto a las funciones vitales, por otro lado es necesario la disección electiva del cuello cuando existe metástasis en ganglios linfáticos. ^(1,4)

En caso de que el tratamiento fracase después de la radioterapia y cirugía como modalidad única existe una modalidad alternativa como quimio radioterapia postoperatoria (radioterapia y quimioterapia con cisplatino en dosis altas) para casos de tumores con estadios avanzados, así reduce el riesgo de recurrencia y ofrece una alta probabilidad de cura, aunque también existen desventajas para esta terapia como son: ^(1, 4)

- No es una terapia selectiva (afecta tanto a células normales como cancerosas).
- La cura es poco probable para tumores grandes.
- En la trimodalidad (cirugía, radio y quimioterapia) aumenta las toxicidades tardías de la radiación (es una toxicidad que puede ser mayor a cualquier terapia utilizada individualmente), incluyendo disfagia crónica y la aspiración que podría aumentar el riesgo a la muerte sin estar relacionado con el cáncer. ^(1,8)
- La quimioterapia puede agravar la mucositis que ocasionó la radiación y por lo tanto la calidad de vida del paciente disminuirá considerablemente.

3.9.2 Terapia dirigida (Targeted Therapy)

El término "terapia dirigida" se refiere a una nueva generación de medicamentos contra el cáncer, diseñados para interferir con un objetivo molecular específico (típicamente una proteína) que se cree que tiene un papel fundamental en el crecimiento o la progresión del tumor. La identificación de objetivos apropiados se basa en una comprensión

detallada de los cambios moleculares subyacentes al cáncer. La identificación molecular del cáncer ha abierto nuevas posibilidades para el desarrollo de inmunoterapias eficaces, mejorando la toxicidad de las terapias actuales contra el cáncer. ^(9,11)

La terapia dirigida tiene como objetivo administrar medicamentos a genes o proteínas particulares que son específicos de las células cancerosas o del entorno tisular que promueve el crecimiento del cáncer. La eficacia de la terapia radica en la liberación dirigida de la terapia en el sitio de la enfermedad mientras se minimizan los efectos secundarios causados a los tejidos normales. A menudo se usa junto con la quimioterapia y otros tratamientos contra el cáncer. La terapia dirigida implica el desarrollo de medicamentos que bloqueen la proliferación de células cancerosas, promuevan la regulación del ciclo celular o induzcan la apoptosis o la autofagia y la administración dirigida de sustancias tóxicas específicamente a las células cancerosas para destruirlas. La terapia dirigida implica el uso de anticuerpos monoclonales o pequeños fármacos orales. ^(9,11)

4. EGFR

Teniendo en cuenta que el cáncer es un problema de salud en todo el mundo la selección a nuevos blancos para el tratamiento del cáncer es tendencia principal de muchos estudios. Actualmente EGFR tiene un papel muy importante en la carcinogénesis y su alta expresión en neoplasias malignas ha provocado que se diseñen varias estrategias para interrumpir su señalización, convirtiéndolo en un blanco terapéutico. ⁽¹³⁾

Los factores de crecimiento son moléculas similares a las hormonas capaces de promover la división y la migración de las células normales, pero el cáncer capturó los mecanismos subyacentes para desencadenar el crecimiento tumoral y la metástasis. El receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGFR) ha servido como miembro fundador de la gran familia de receptores del factor de crecimiento que albergan una función intrínseca de tirosina quinasa. ⁽¹³⁾

El EGFR es una proteína de superficie celular de 170 kDa involucrada en muchos procesos biológicos, como la proliferación, migración, síntesis de ADN y adhesión. La familia ErbB de los receptores tirosina-quinasa han sido los más estudiados para tratamiento de cáncer, se compone de 4 receptores: EGFR (conocido también como ErbB-1/HER 1), ErbB-2 (neu, HER2), ErbB-3 (HER3) y ErbB-4 (HER4), estos receptores se encuentran en la membrana plasmática de las células y normalmente EGF está presente durante el desarrollo embrionario, durante la organogénesis de varios órganos precedentes del mesodermo y ectodermo como cerebro, corazón y pulmón, posteriormente en el adulto EGF pierde esta función pero los receptores ErbB se dice que están presentes en los conductos mamarios durante la pubertad y la producción de leche postparto, estos receptores se expresan ampliamente en tejidos epiteliales, mesenquimales y neuronales y su función es regular la división celular, la proliferación, la diferenciación y otros procesos en las células normales. (12, 13, 16)

En condiciones de reposo, el EGFR existe predominantemente en una forma monomérica autoinhibida, pero la unión del ligando confiere una conformación preparada para formar homodímeros o heterodímeros que contienen HER2 u otros receptores. La activación del receptor (Imagen 10) depende de la formación de un dímero asimétrico de dominios de quinasa, en el que un dominio de quinasa activa alostéricamente al otro. En el dímero asimétrico, el lóbulo C del dominio quinasa de la “quinasa activadora” interactúa con el lóbulo N de la “quinasa receptora”, que estimula catalíticamente a esta última. A partir de entonces, la quinasa receptora transfosforila residuos de tirosina específicos de la quinasa activadora. Las tirosinas recién fosforiladas sirven como sitios de unión para varios adaptadores como GRB2, enzimas citoplasmáticas, por

ejemplo PLC-gamma o factores específicos involucrados en la regulación de la transcripción como STAT3. Juntos, estos efectores de señalización y proteínas adaptadoras vinculan los receptores activados directa o indirectamente con las vías intracelulares canónicas, así como con la maquinaria endocítica, que insensibiliza los receptores activos. Es importante destacar que varios sitios de acoplamiento de tirosina de EGFR pueden unirse a más de un adaptador o efector. En conjunto, esta configuración permite que el EGFR activado por ligando estimule simultáneamente múltiples rutas de señalización intracelular y gane robustez. (12, 13)

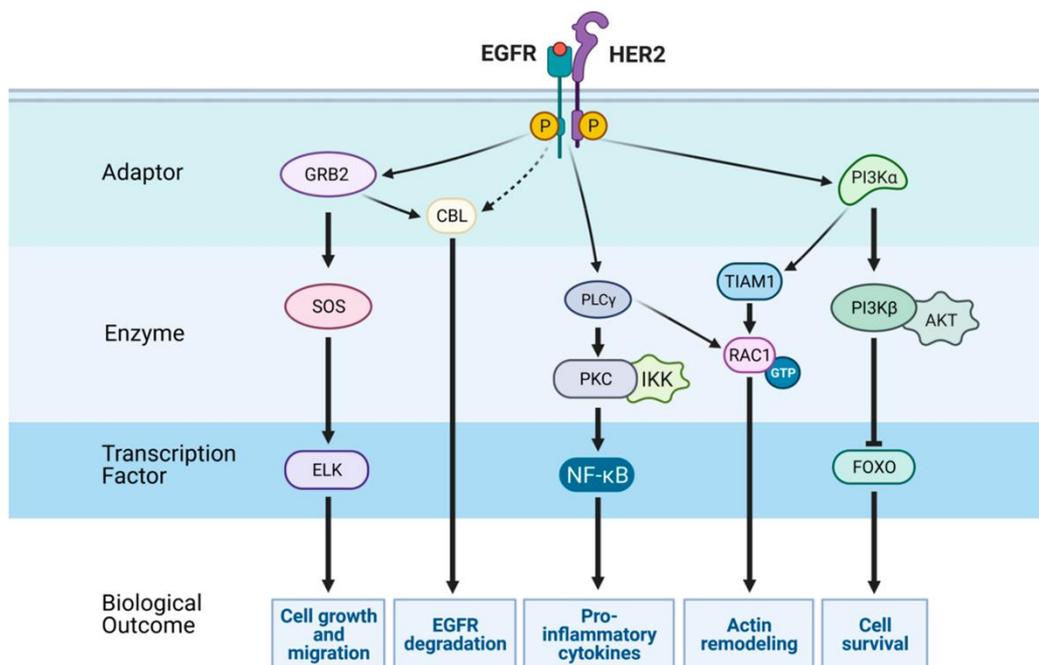


Imagen 10 -. Vías de señalización mediadas por EGFR. Las tirosina quinasas receptoras (RTK), como EGFR, se activan rápidamente mediante la unión del factor de crecimiento y, posteriormente, transmiten señales a través de varias vías para impulsar cambios en los fenotipos celulares.

4. 1 EGFR y su papel en el cáncer

La función fisiológica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es regular el desarrollo y la homeostasis del tejido epitelial. En entornos patológicos, principalmente en el cáncer de mama, de pulmón y en el glioblastoma, el EGFR es un impulsor de la tumorigénesis. ⁽¹²⁾

Entre los principales hallazgos encontrados en múltiples investigaciones sobre cáncer, se encuentran el exceso de expresión de EGFR y las anomalías estructurales en el receptor o sus ligandos. ⁽¹²⁾

El EGFR se expresa en células normales en niveles que van desde 20 000 hasta 200 000 copias por célula. Sin embargo, en células de tumores de origen epitelial como el de pulmón, cabeza y cuello, páncreas, ovario, colon, riñón, vejiga y en los gliomas, el EGFR está sobreexpresado y puede llegar a niveles 20 veces mayores que lo normal. También se ha demostrado que la sobreexpresión de EGFR se correlaciona con un peor pronóstico, mayor índice de proliferación, mayor capacidad invasiva y reducción de sobrevida. ⁽¹³⁾

La presencia de un número excesivamente alto de copias de EGFR en la célula provoca un aumento de la sensibilidad a sus ligandos que, incluso a concentraciones muy bajas, son capaces de estimular las células e inducir proliferación celular. Por otro lado, el proceso de internalización de los receptores en estas circunstancias, es más lento porque se excede la capacidad de endocitosis de la célula, por lo que estas no pueden reprimir adecuadamente la transmisión de las señales mitogénicas que se generan de una forma continuada. ⁽¹²⁾

La actividad incontrolada EGFR se ha implicado en muchos factores del crecimiento tumoral, incluyendo la promoción de proliferación celular, la angiogénesis, la invasión, la metástasis y la supervivencia. La activación

del EGFR induce la expresión de ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S, y favorece una rápida y descontrolada proliferación celular. La señalización a través del EGFR incrementa la producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleucina 8 y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), y favorece el proceso de angiogénesis que resulta vital para el crecimiento tumoral. Se ha demostrado que la activación del EGFR induce el desprendimiento de las células de la matriz extracelular e induce la síntesis de matriz-metaloproteasas (MMP) en especial MMP9, favoreciendo la degradación de la membrana basal, la invasión celular y el proceso de metastización. Se ha propuesto que la activación del receptor induce la expresión de Bcl2, una proteína anti-apoptótica, favoreciendo la sobrevida de las células tumorales. ^(12, 13)

Además, el EGFR se reconoce cada vez más como un biomarcador de resistencia en tumores, ya que se ha descubierto que su amplificación o mutaciones secundarias surgen bajo la presión de los fármacos. Se descubrió que el EGFR actúa como un fuerte indicador de pronóstico en los cánceres de ovario, cuello uterino, vejiga y esófago. En estos cánceres, el aumento de la expresión de EGFR se asoció con tasas de supervivencia general o sin recurrencia reducidas en el 70 % (52/74) de estudios. ⁽¹⁷⁾ La sobreexpresión de EGFR da como resultado un mal pronóstico en el cáncer oral y su activación se asocia con el fenotipo maligno, la inhibición de la apoptosis y el aumento del potencial metastásico. ⁽¹³⁾

4.2 EGFR y su papel en COCE

EGFR cuando se une a su ligando y es activado (Imagen 11) libera una serie de moléculas de señalización que activan varias vías importantes para el crecimiento, progresión y supervivencia del tumor, destacando que cuando EGFR está sobre expresado se asocia a un mal pronóstico y a un fenotipo maligno además de metástasis, también se demuestra que esta sobreexpresión se manifiesta por angiogénesis e inhibición de la apoptosis. (12, 13)

Su expresión es de más del 80 % en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello por lo que se asocia a un resultado clínico desfavorable, alta recurrencia y baja tasa de supervivencia. (12,13, 16)

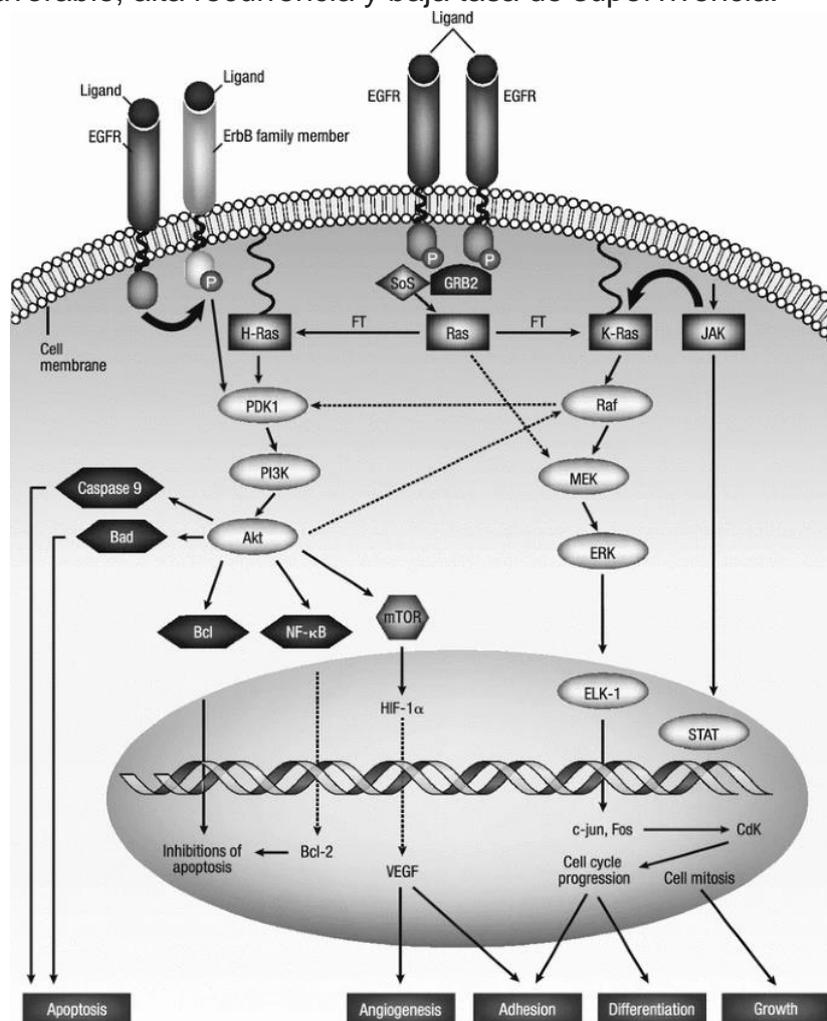


Imagen 11. Receptor EGFR y sus vías de señalización cascada abajo potencialmente involucradas en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. ⁽¹⁸⁾

4.3 Terapia dirigida en EGFR

Como se ha expuesto hasta ahora, existe un amplio sustento experimental y clínico sobre el papel clave del EGFR en muchos tumores, constituyendo una excelente diana terapéutica. De las múltiples estrategias estudiadas para inhibir al receptor, dos aproximaciones terapéuticas se han mostrado como las más consistentes y son las más ampliamente desarrolladas en la clínica:

Los anticuerpos monoclonales, que se unen al dominio externo del receptor con alta afinidad, compitiendo con sus ligandos naturales y bloqueando así, la activación de aquel. Ellos comparten una secuencia de distintos mecanismos de acción: unión extracelular, internalización del complejo receptor-anticuerpo, inhibición de la vía de señalización mediada por EGF y potencial estimulación de la respuesta inmunológica. ^(12, 13)

Las pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad enzimática tirosina quinasa del receptor. (TKIs). Son moléculas sintéticas fundamentalmente derivados quinazolínicos, de bajo peso molecular que interactúan con el dominio tirosina quinasa intracelular de varios receptores, incluyendo EGFR, inhibiendo la fosforilación inducida por ligando. Estas moléculas son generalmente competidores reversibles del sitio de unión al ATP en el dominio catalítico intracelular de la tirosina quinasa. ⁽¹²⁾

A pesar de los recientes avances en los tratamientos del cáncer como la radio y quimioterapia aún las tasas de supervivencia y calidad de vida del paciente no han aumentado es por eso que actualmente las terapias se han desplazado a nivel molecular, en particular al receptor EGFR que se basan en los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de la tirosina-quinasa. ⁽¹⁸⁾ La relación de la sobreexpresión EGFR y el comportamiento de las células tumorales dieron pie a los anticuerpos monoclonales que

dirigidos a este receptor pueden resultar muy efectivos como agentes terapéuticos para el cáncer. ⁽¹²⁾

A pesar de la actividad inmunosupresora de algunos cánceres incluyendo el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se ha demostrado que la terapia génica inmunopotenciadora que activa los linfocitos T anti tumorales promueven una mayor tasa de supervivencia y respuestas factibles para los tumores.⁽¹⁶⁾ La expresión de EGFR y sus vías de transducción de señales desempeñan un papel importante en cuanto a la respuesta de radioterapia y quimioterapia. ⁽¹²⁾

Un fármaco contra EGFR es el Cetuximab que es un anticuerpo anti-receptor de EGFR, fue la primera terapia dirigida aprobada para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello que contribuye a la supresión del crecimiento del tumor y a la apoptosis de las células tumorales, el cual en xenoinjertos también inhibe la proliferación de las células malignas, además de que se ha evidenciado en conjunto con quimioterapia con platino mejora la supervivencia en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con metástasis o recurrente, pero en conjunto con la radiación el Cetuximab no presenta éxito ni como modalidad de primera línea. ^(16, 18)

Agulnik, M. y Cols. en el año 2012 trabajó un estudio de Fase III con 424 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello locorregionalmente avanzado en donde compara Cetuximab en dosis altas en conjunto con radioterapia, en el cual demuestra que mejoró significativamente la mediana de supervivencia general, en cuanto a los resultados de eventos adversos se demostró el 93% contra el 94% con radiación como modalidad única, dermatitis por radiación, 86% frente a 90% con radioterapia sola y erupción acneiforme con 87 % frente al 10%, las tasas de supervivencia a cinco años fueron de 45,6 % para cetuximab/radiación versus 36,4 % para radiación sola. ⁽¹⁸⁾

Un anticuerpo monoclonal más contra EGFR como es el Panitumumab evidenció que activa las células NK (Natural Killer). ⁽¹⁶⁾

Inhibidores selectivos de la tirosina-quinasa de EGFR como el erlotinib ha sido objeto de estudio de igual manera, presentó el 21% de respuesta benéfica cuando se trató con fármacos quimioterapéuticos como cisplatino pero de igual manera como modalidad única sólo tuvo un 3% de respuesta benéfica. ⁽¹⁶⁾

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales causas de muerte en el mundo es el cáncer ya que los factores etiológicos más importantes como el tabaco y el alcohol se consumen a nivel mundial y cada vez se presenta en edades más tempranas. En la región de cabeza y cuello el predominio del carcinoma oral de células escamosas ocupa el 90 % de las neoplasias malignas orales y generalmente se diagnostican en etapas avanzadas y su tasa de supervivencia después del diagnóstico es de 5 años, al ser un cáncer muy agresivo, los tratamientos convencionales muestran un pronóstico poco favorecedor, con una cantidad de efectos secundarios abrumadora, afectando funciones elementales del paciente como la fonación y la alimentación ya que son poco específicos para las células tumorales, por ello, surge la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas más favorecedoras para el paciente.

6. JUSTIFICACIÓN

La terapia dirigida podría ser una opción para el tratamiento del cáncer oral, debido a que su blanco terapéutico son exclusivamente las células del tumor, causa menos efectos secundarios en los tejidos sanos y mejora la tasa de supervivencia. Algunos estudios muestran que en el 80% de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello hay una sobreexpresión de EGFR, lo que podría considerarse un potencial blanco terapéutico, ya que este receptor participa en el crecimiento y proliferación de células tumorales, además la sobreexpresión de EGFR en el COCE se asocia con un mal pronóstico y una deficiente sensibilidad tanto a radioterapia como quimioterapia.

7. HIPÓTESIS

EGFR está sobreexpresado en COCE por lo tanto es un blanco terapéutico importante.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Identificar la inmunoexpresión de EGFR en el carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado y bien diferenciado.

8.2 Objetivos secundarios

Comparar la inmunoexpresión de EGFR en el carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado y bien diferenciado.

9. METODOLOGÍA

9.1 Tipo de estudio: transversal descriptivo

9.2 Población de estudio: Muestras de COCE del año 2017 del Departamento de Patología y Medicina bucal del Departamento de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

9.3 Tamaño de muestra: a conveniencia.

9.4 Criterios de selección:

9.4.1 Inclusión:

- Muestras de hombres y mujeres sin restricción de edad.
- Bloques de parafina con suficiente cantidad de tejido para realizar los cortes.

9.4.2 Exclusión:

- Muestras con expediente clínico incompleto.

9.4.3 Eliminación:

- Desprendimiento de tejido la realización de la técnica de inmunohistoquímica.
- Bloques que durante los niveles de corte se pierda el área representativa del tumor a estudiar.

9.5 Selección de muestras:

Se realizó una búsqueda de los casos diagnosticados como COCE en las bitácoras de Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial del DEPel, se solicitaron las laminillas de H&E para la confirmación de diagnóstico (realizada por el Dr. Roberto Onner Cruz Tapia) y con ello la selección de los casos cumplan con los requisitos para su procesado.

9.6 Técnicas moleculares:

9.6.1 Ensayo de inmunohistoquímica

Se realizó con el apoyo de la Dra. Lorena Correa Arzate.

La inmunohistoquímica es un procedimiento que tiene como objetivo detectar, amplificar y hacer visible un antígeno específico, que generalmente es una proteína (en este estudio el objetivo es EGFR). Esta técnica permite identificar la localización de una sustancia específica a nivel tisular o celular. Se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (antígeno primario). Estos anticuerpos pueden tener unida una enzima o esta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al primario.

Los cortes se realizaron a 5 μm sobre laminillas previamente sialinizadas.

En primer instancia se desparafinó la laminilla colocándola 5 minutos en Xilol, otros 5 minutos en Xilol, 5 minutos en Xilol-alcohol, después colocamos en alcohol al 100% 3 minutos, 3 minutos nuevamente en alcohol al 100%, 3 minutos en alcohol ahora al 90% y finalmente 3 minutos en alcohol al 90%, se lavó por 1 minuto en el chorro de agua sin

que toque el tejido para evitar desprendimiento, posteriormente en un vaso Coplin se aforó con solución de citratos, se tomó una bandeja con agua y se precalentó 30 segundos, se volvió a calentar 3.5 minutos con una potencia de 7 y se dejó enfriar por 5 minutos, pasados los 5 minutos se debe de abrir la tapa para dejar enfriar por una hora, se eliminó la solución de citratos y se lavó 3 veces con buffer de fosfato (PBS) por 3 minutos cada lavado, en seguida se realizó el bloqueo con peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos. Nuevamente se realizaron lavados con PBS durante 3 minutos. Se delimitaron las muestras con lápiz hidrofóbico, y se realizó el bloqueo del marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 1% durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno, se dejaron sumergidas las laminillas en Tritón x-100 para permeabilizar el tejido, durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos. Y se colocó el anticuerpos primarios EFGR de marca Santa Cruz ®Biotecnology, en una dilución 1:200. Se dejaron en incubación durante 24 horas en cámara húmeda. A las 24 horas, se eliminó el anticuerpo primario con TBS X1 hicimos 3 lavados por 3 minutos cada uno. Se colocó el anticuerpo secundario por 20 minutos y se hicieron 3 lavados con TBS, cada uno por 3 minutos, se colocó la peroxidasa exógena por 10 minutos y nuevamente se realizaron 3 lavados por 3 minutos cada uno con TBS, se mezcló una solución DAB buffer con 1000ml y una gota de cromógeno, colocamos en la laminilla y se dejó reposar por 5 minutos, se eliminó la solución en el bote de desechos inactivando con hipoclorito de sodio, colocamos en agua corriente por 5 minutos tratando de que no caiga directamente en la laminilla y otros 5 minutos en agua desionizada evitando de igual manera que cayera en la laminilla, posteriormente las muestras se colocaron en un vaso de cristal y se colocó hematoxilina durante 1 minutos para la contratinción, pasado el tiempo se llevó a agua corriente para eliminar el excedente de tinción. Se realizó el aclarado y deshidratación con alcoholes de diferentes concentraciones y con xilol para realizar su montaje con resina hidrofóbica.

Análisis de inmunoexpresión

Se tomaron las fotomicrografías con el microscopio óptico identificando las zonas de inmunoexpresión (zona color marrón).

10. RESULTADOS

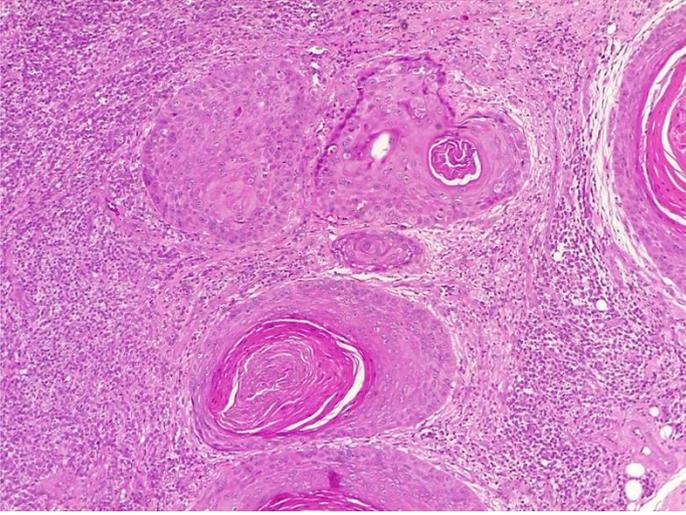
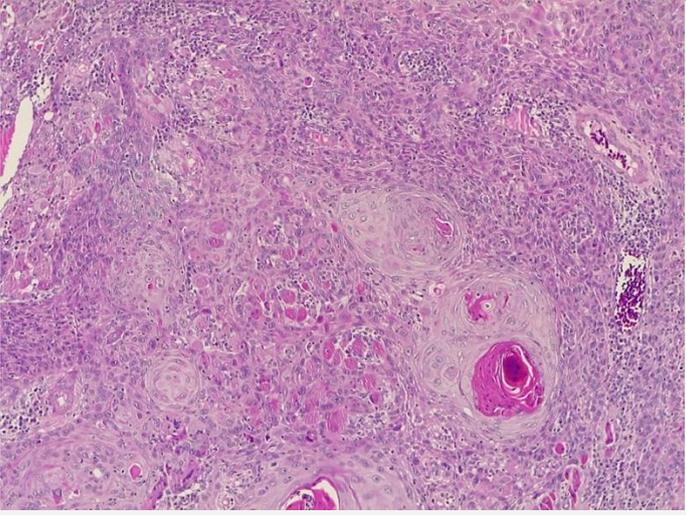
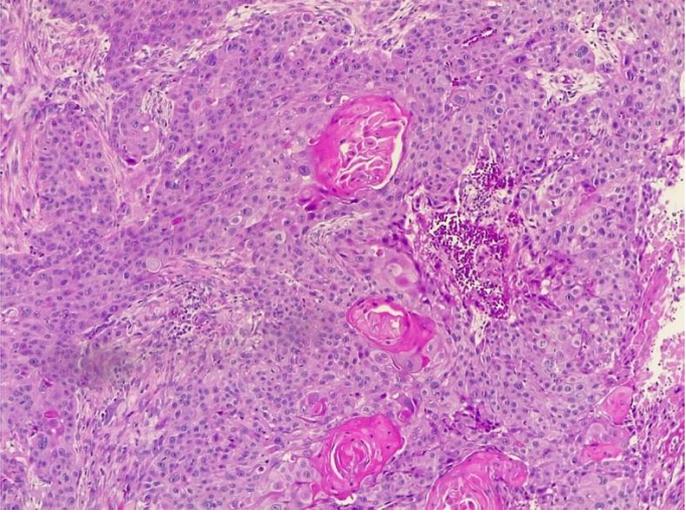
10.1 Población de estudio:

Se tomaron 3 casos que cumplieron los criterios de selección, el 66.6% de los pacientes fueron de sexo femenino y el rango de edad fue 31 a 81 años, la localización anatómica más frecuente el borde laterales de la lengua.

Las características clínicas detalladas de los pacientes se describen en la tabla 5.

<u>Número de muestra</u>	<u>Localización anatómica</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>Sexo</u>	<u>Clasificación histológica</u>
Caso 1	Piso de boca y borde de lengua	72 años	Hombre	Bien diferenciado
Caso 2	Maxilar	81 años	Mujer	Moderadamente diferenciado
Caso 3	Borde de lengua	31 años	Mujer	Moderadamente diferenciado
COCE- Carcinoma oral de células escamosas				

A continuación se presentan las imágenes histológicas de los casos seleccionados.

<p>Imagen A <u>Caso 1</u> COCE bien diferenciado Fotomicrografía a 400 aumentos, teñida con H&E. Se pueden observar perlas de queratina y zonas de pleomorfismo nuclear y celular.</p>	
<p>Imagen B <u>Caso 2</u> COCE moderadamente diferenciado Fotomicrografía a 400 aumentos, teñida con H&E, se observan zonas de pleomorfismo celular y nuclear.</p>	
<p>Imagen C <u>Caso 3</u> COCE moderadamente diferenciado Fotomicrografía a 400 aumentos, teñida con H&E, se observan zonas de pleomorfismo celular y nuclear.</p>	

10.2 Análisis de inmunoexpresión

Tabla 6. Resultados del análisis de inmunoexpresión de los casos de COCE.

Caso	Reacción	Proporción	Intensidad	Localización
1	Positiva	20%	Moderada (++)	Membranosa
2	Negativa	-	-	-
3	Positiva	10%	Moderada (++)	Membranosa

CASO 1

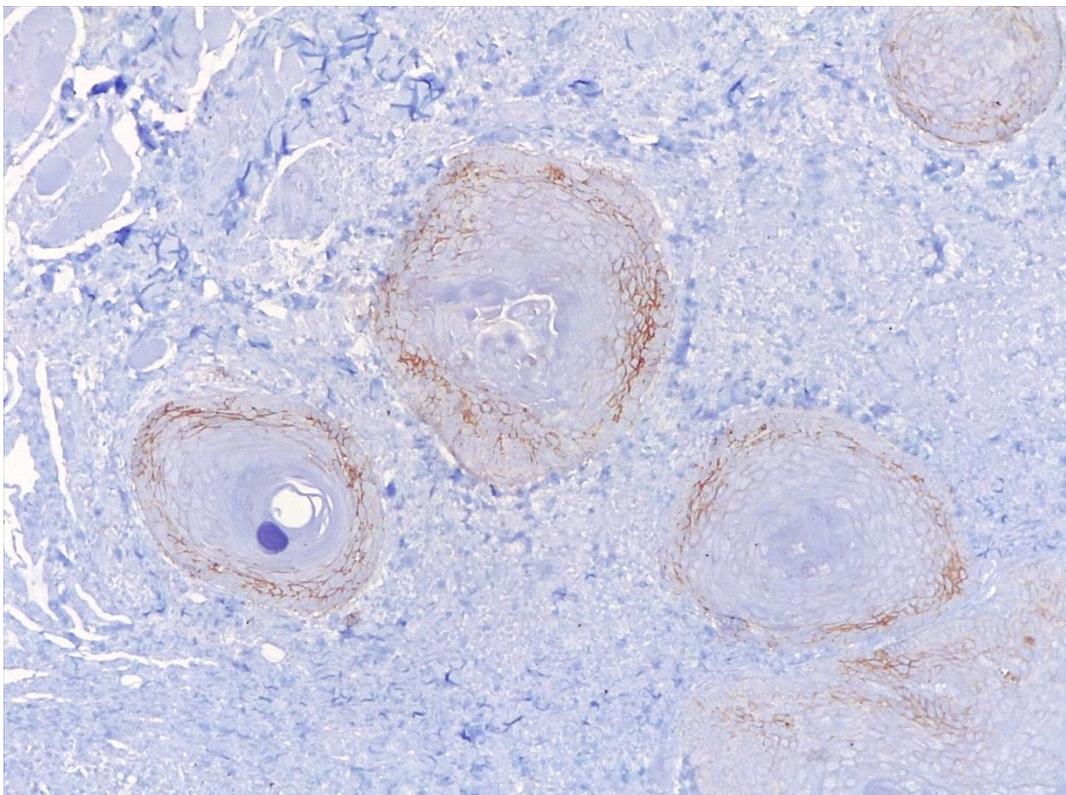


Imagen A

En el caso 1 se puede observar estas microfotografías donde la reacción fue positiva a EGFR con una proporción del 20% con intensidad moderada ubicada en la membrana.

CASO 2

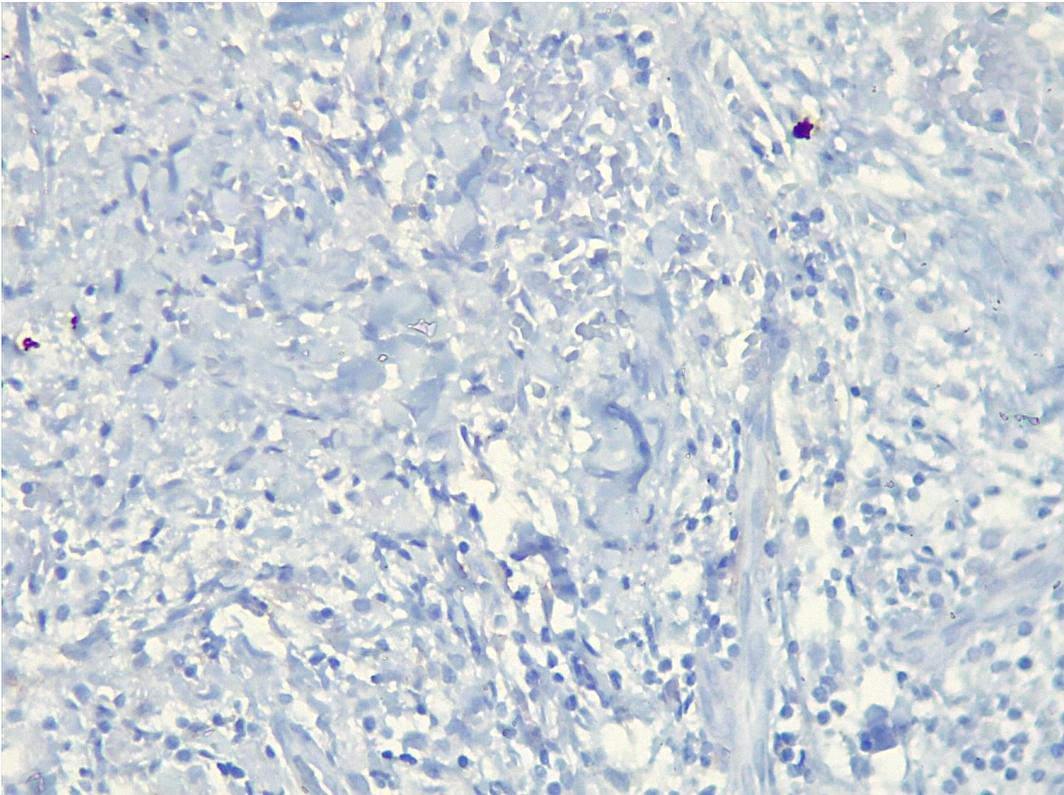


Imagen A

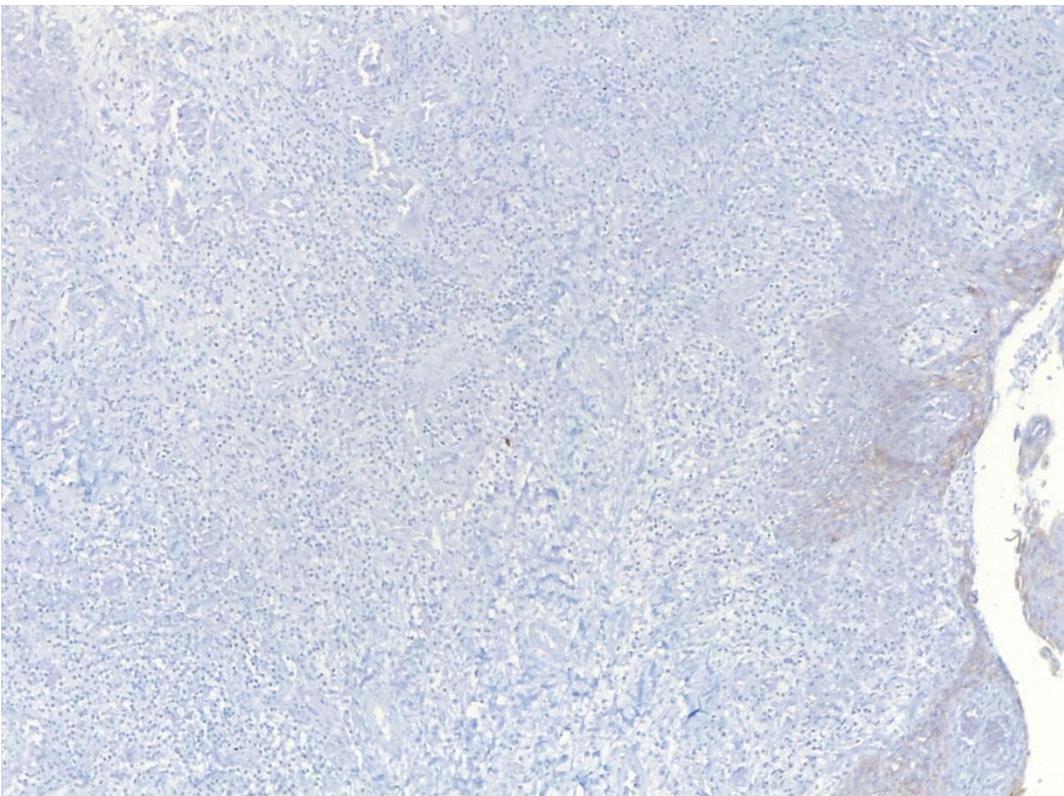


Imagen B

En el caso 2 hubo una reacción negativa a EGFR

CASO 3

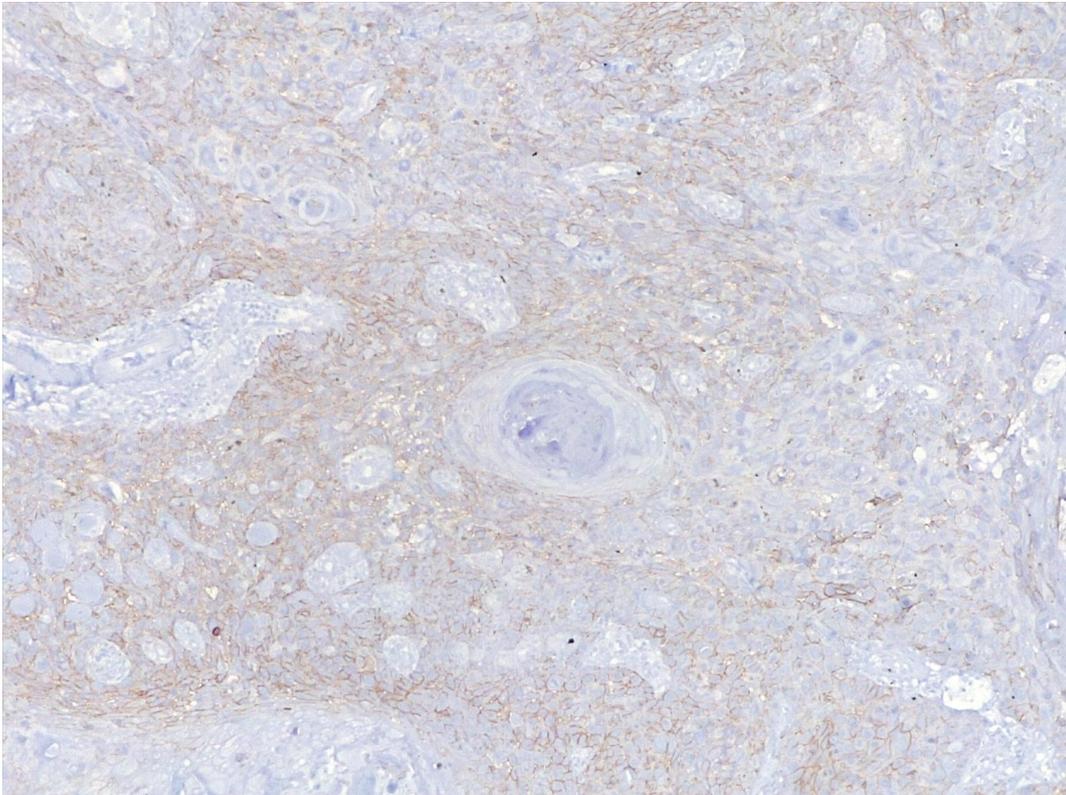


Imagen A

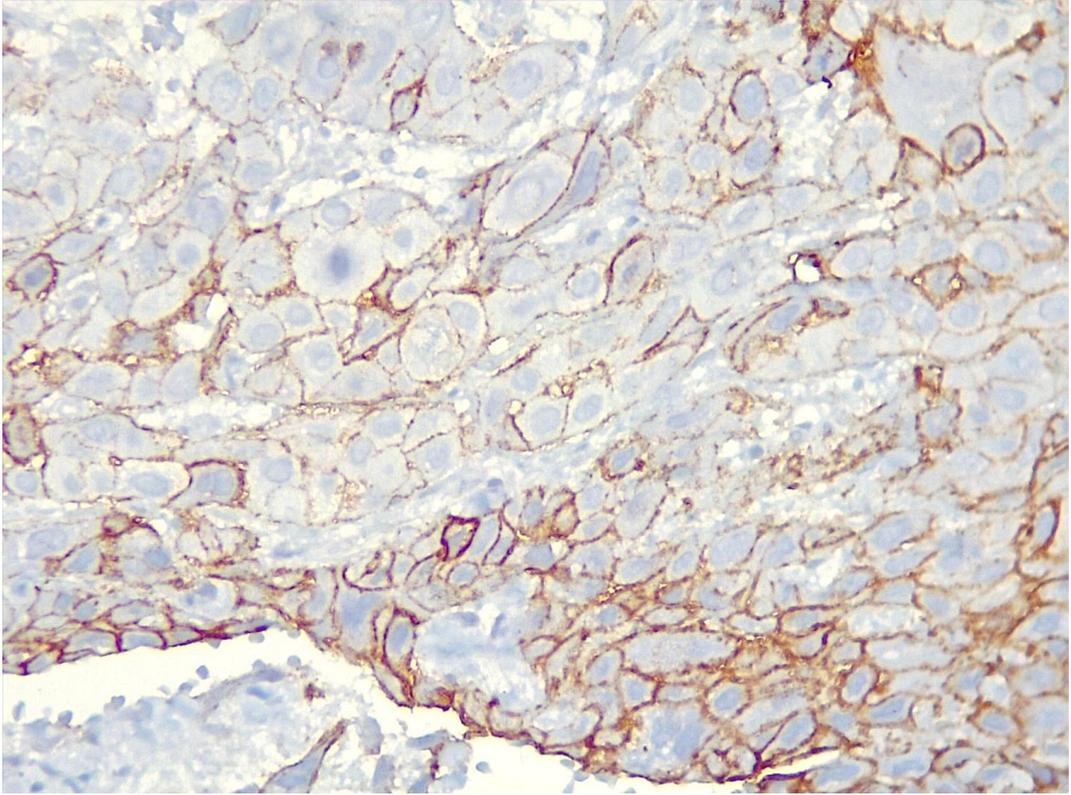


Imagen B

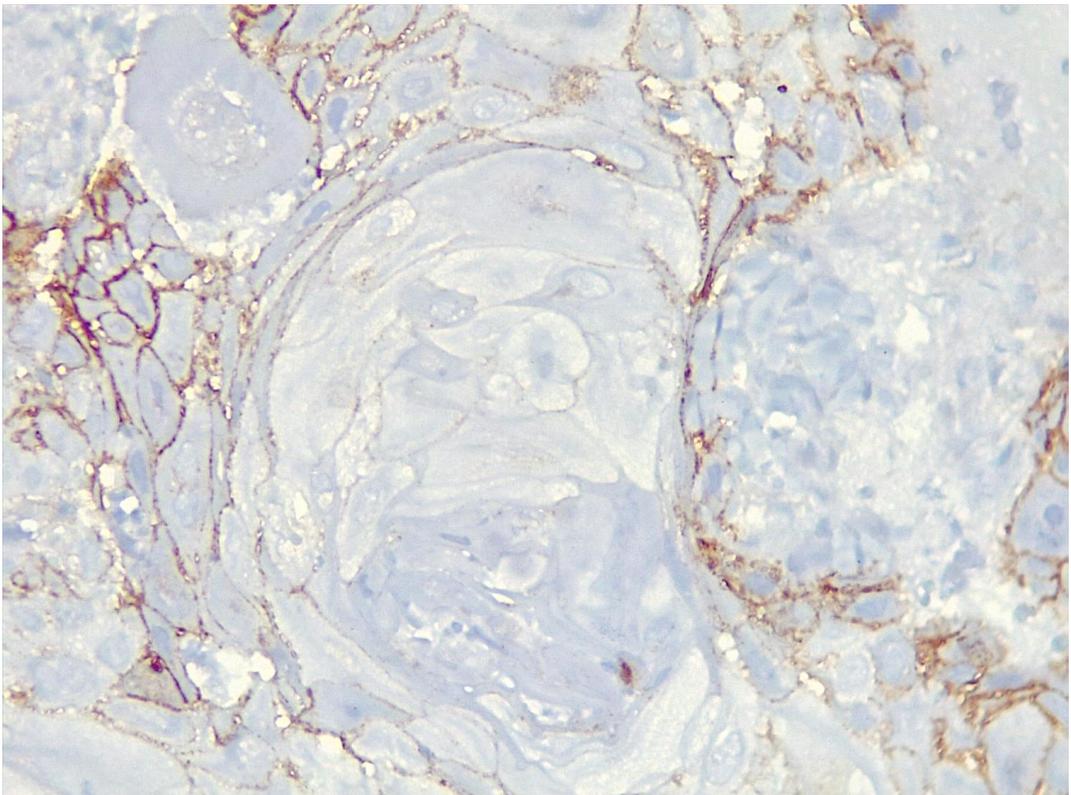


Imagen C

En estas microfotografías a 400X del caso 3 se puede observar una reacción positiva a EGFR con una proporción del 10 % con una intensidad moderada que se localiza en la membrana.

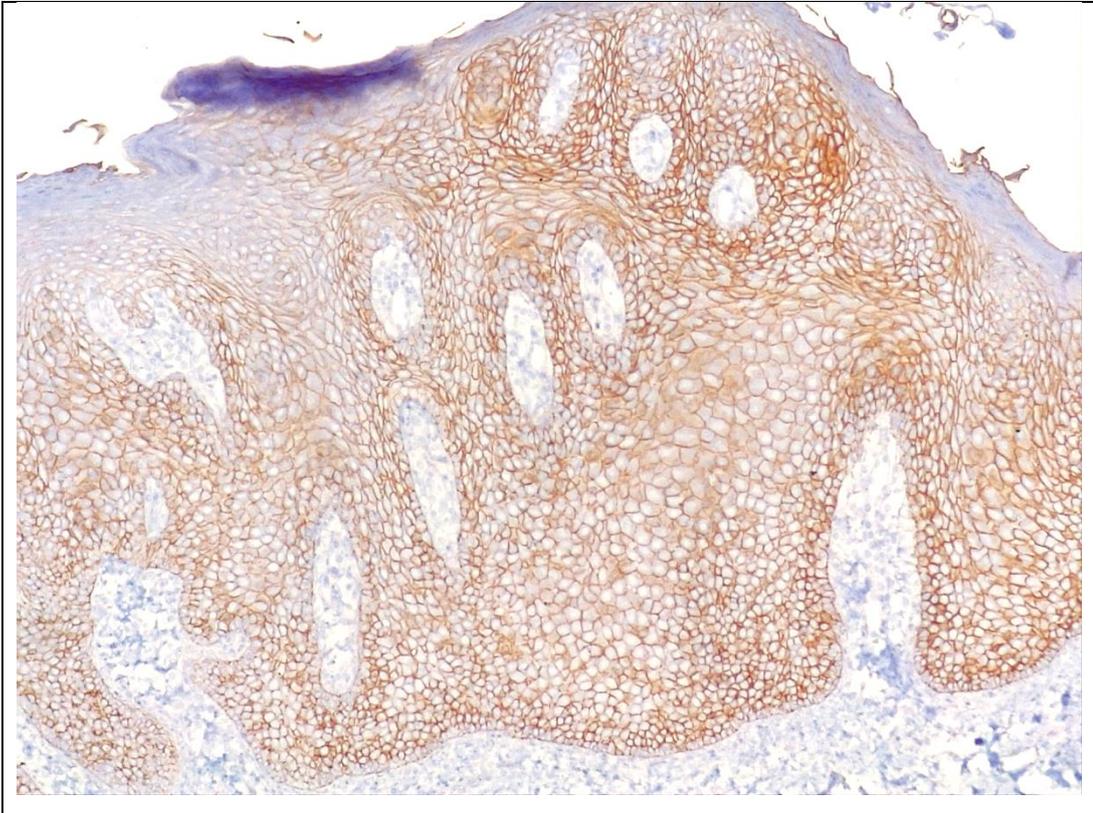


Imagen A **CONTROL – LENGUA**

En estas microfotografías a 400X de una muestra de lengua sana utilizada como grupo control se puede observar una reacción positiva a EGFR en la membrana, con un patrón conocido como malla de gallinero.

11. DISCUSIÓN

El papel clave de EGFR en la carcinogénesis lo lleva a ser un nuevo foco de investigación con el objetivo de encontrar nuevas terapias para el tratamiento del COCE. La diferenciación y proliferación del crecimiento celular se basan en la estimulación de los procesos celulares inducida por el factor de crecimiento. EGFR juega un papel importante en la diferenciación y proliferación de las células de mamíferos. El 80 % de los carcinomas de células escamosas se caracterizan por una sobreexpresión de EGFR, lo que resulta en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello exhiben un grado variable de comportamiento de la tasa de crecimiento celular, la diferenciación y la metástasis, por eso resulta atractivo identificar el funcionamiento de EGFR en el COCE, adicionalmente la sobreexpresión de EGFR se considera un objetivo atractivo para la terapia anti-EGFR en varios tumores, pudiendo ser una alternativa en el tratamiento del COCE.

En estudios previos se han encontrado diferentes hallazgos.

Hashmi A et al (26)., realizaron un estudio para determinar la expresión inmunohistoquímica de EGFR en 115 casos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, 52 casos (45.2%) fueron positivos y 53 casos (46.1%) fueron negativos para la expresión de EGFR, se observó una expresión intensa de EGFR en el 13.9 % (16 casos), mientras que el 16.5 % (19 casos) y el 23.5 % (27 casos) revelaron una expresión de EGFR moderada y débil, respectivamente. Se observó una asociación significativa de la expresión de EGFR con el estadio del tumor y la supervivencia libre de enfermedad.

En un estudio similar realizado por Laimer K et al (27) , la inmunotinción de EGFR fue positiva en el 73.42% de los casos (n=80).

Diniz Freitas, M. et al. (28) realizó un estudio en 47 muestras de COCE. La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico estuvo ausente o débil en 12 casos (25.5%) y moderada o intensa en 35 casos (74.5%). Sin embargo, la expresión de EGFR no mostró asociaciones estadísticamente significativas con ninguna de las variables clínicas, histológicas, biológicas o pronósticas consideradas.

Fatemeh Shahsavari, et al (29) analizó a 46 pacientes, 23 diagnosticados con COCE y 23 diagnosticados con carcinoma de células escamosas de esófago y obtuvo resultados similares a los estudios mencionados; comenzando con COCE, 5 de los casos (21.7%) presentaron una baja expresión y 18 de los casos (78.3%) una expresión alta, no hubo relación con la edad, el sexo y el grado de COCE, en cambio en el carcinoma de esófago si hubo relación únicamente con el estadio, en 6 de los casos (26.1%) hubo una baja expresión y en 17 de los casos (73.9%) hubo una alta expresión.

Los resultados muestran que la expresión de EGFR es compleja en el COCE, ya que presenta porcentajes variables de expresión en los tumores analizados, algunas variables podrían considerarse para tener resultados más confiables, como ampliar el número de pacientes en los estudios y poder estratificar por sexo, edad o localización anatómica.

Otra variable importante a tomar en cuenta es la técnica de inmunohistoquímica, así como el método de cuantificación de la expresión, si se realizó de manera cualitativa o cuantitativa.

12. CONCLUSIONES

Encontramos una expresión de EFGR en membrana de la mayoría de los carcinomas analizados, sin embargo, es necesario que se realicen estudios en una población con mayor número de muestras, para poder buscar si existe asociación entre la expresión de EFGR y el tipo de COCE o con alguna variable clínica como el sexo, localización anatómica o inclusive la edad, a pesar de ser un estudio exploratorio, no debemos descartar el potencial terapéutico de EFGR. La carcinogénesis es un proceso amplio y complejo, encontrar nuevas moléculas que nos permitan entender este proceso en clave para encontrar nuevas terapias.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnson D. Burtness E., B., Leemans C., Lui V. Bauman J., Grandis J. Head and neck squamous cell carcinoma. Nature reviews Disease primers.[Internet]. 2020 [Consultado el 20 Feb 2023]; 6(1) Disponible en : <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
2. Krahl D., Rose C. (2021). Histopatología de las Lesiones Hiperplásicas y Neoplásicas Orales. En: Schmidt, E. (eds) Enfermedades de la Mucosa Oral. Springer, Cham. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-030-82804-2_6
3. Adel K. John K., Grandis J., Takata T., Slootweg P. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th. ed. Francia: WHO; 2017
4. Scully C. Oral and Maxilofacial Medicine, The Basis of Diagnosis and treatment 3: Oral and maxillofacial medicine.Elsevier Health Sciences, 2013, 435 pag.
5. García M. Carcinoma oral de células escamosas, gravedad del diagnóstico tardío: reporte de un caso y revisión de la literatura Revista científica Multidisciplinaria de Prospectiva [Internet]. 2020 [Consultado 26 Feb 2023]; 28 (3), Disponible en: <https://cienciaergosum.uaemex.mx/article/view/13613/12549>
6. Ferreyra R., Baró M., Castagno J., Rocamundi M., Viotto J., Guía de Anatomía Patológica Bucal [Internet]. 2016 Córdoba: SIMA, [Revisión Abril 2015 Consultado 01 Marzo 2023]. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/16070>
7. American Society of Clinical Oncology. Cáncer Oral y Orofaringeo: Estadios y grados. [Internet]. [Consultado 22 Feb 2023] Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-oral-y-orofaringeo/estadios-y-grados>.
8. Charles D., Bednarek L., Miller L. Pharmacology in rehabilitation. 5th. Filadelfia: McGraw-Hill; 2022

9. Rodríguez J. Martínez L. Cruz N. Terapia Génica para el tratamiento del cáncer. Revista Colombiana de Cancerología [Internet]. 2014 [Consultado 22 Feb 2023]; 18(1). Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-articulo-terapia-genica-el-tratamiento-del-S0123901514702227>
10. U. S. Food and Drug Administration. How Gene Therapy Can Cure or Treat Diseases. [Internet]. [Consultado 25 Feb 2023]; Disponible en: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/how-gene-therapy-can-cure-or-treat-diseases>
11. *Montaño M., Bravo D., Méndez M., Alarcón O., Ibañez E. Strategies for Targeting Gene Therapy in Cancer Cells With Tumor-Specific Promoters. Frontiers in oncology [Internet]. 2020 [Consultado 26 Feb 2023]; 10, 605380. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605380>
12. Pidone F., Noguti J., Fujiyama C., Araki D. Effective Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) for Treating Oral Cancer: A Promising Approach. Anticancer Research [Internet]. 2014 [Consultado 28 Feb 2023]; 34 (4). Disponible en: <https://ar.iijournals.org/content/34/4/1547.long>
13. Sánchez T., González O., El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. Revista Habanera de ciencias médicas [Internet]. 2010 [Consultado el 27 de Feb 2023]; 9 (2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200006
14. Roskoski R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein- tyrosine kinases in human cancers. ELSEVIER [Internet]. 2018 [Consultado 28 Feb 2023]; 139 (4): 295–411. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104366181831747X?via%3Dihub>

15. Torres R., Torres N., Hernández J., Pérez Y., Hernández A., Argueta L. Epidemiología reportada de cáncer de labio, cavidad oral y orofarínge en México. Revista médica del IMSS [Internet]. 2020 [Consultado el 29 Feb 2023]; 58 (4): 494-507. Disponible en: http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/3621/4111
16. Saba N., Georgia Z., Haigentz M., Bossi P., Rinaldo A., Rodrigo P., Makitie A., Takes R., Strojan P., Vermorken J., Ferlito A. Targeting the EGFR and immune pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) : Forging a new alliance. NIH [Internet]. 2019 [Consultado 29 Feb 2023]; 18 (11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6830522/>
17. Mitsudomi T., Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. The Febs journal [Internet]. 2010 [Consultado 29 Feb 2023]; 277 (2). 301-308. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x>
18. Agulnik M. New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Springer [Internet] 2012 [Consultado 01 Marzo 2023]; 29: 2481-2491. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-012-0159-2>
19. Martín de Civetta MT., Domingo J. Carcinogénesis. salud pública de México [Internet]. 2011 [Consultado 01 Marzo 2023]; 53(5). Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v53n5/a08v53n5.pdf>
20. de la Rosa E., Anaya G., Godoy L. Manual para la Detección de Alteraciones de la Mucosa Bucal Potencialmente Malignas [Internet]. México: : 2003 [revisión 23 de julio del 2003, consultado 01 Marzo de 2023]. Disponible en:

http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/saludbucal/descargas/pdf/alteraciones_mucosa_bucal.pdf

21. Escribano M., Bascones A. Leucoplasia oral: Conceptos actuales. Av. Odontoestomatol [Internet]. 2008 [Consultado 03 de Marzo 2023]; 25 (2): 83-97. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v25n2/original3.pdf>
22. Brad W., Terry A. Oral Cancer and Precancerous lesions. A Cancer Journal for Clinicians [Internet]. 2002 [Consultado 03 Marzo 2003]; 52 (4): 195-215. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/canjclin.52.4.195?sid=nlm%3Apubmed>
23. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. Oral and Maxillofacial Pathology [Internet]. 2018 [Consultado 07 Marzo 2023]; 125 (6). Disponible en: [https://www.oooojournal.net/article/S2212-4403\(18\)30854-X/fulltext](https://www.oooojournal.net/article/S2212-4403(18)30854-X/fulltext)
24. Hernández J., Jacinto L., Jiménez M., Macario A., Hernández F., Alcántara A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal [Internet]. 2013 [Consultado el 08 Marzo 2023]; 18 (2). 306-311. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613885/>
25. Meza G., Muñoz J., Páez C., Cruz B., Aldape B. Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de México . Experiencia de 5 años. Av. Odontoestomatol [Internet]. 2009 [Consultado 08 Marzo 2023]; 25 (1). Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852009000100003
26. Hashmi A., Hussain F., Aijaz S., Irfan M., Khan Y., Naz, S., Faridi N., Khan A., Edhi M. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in South Asian head and neck

- squamous cell carcinoma: association with various risk factors and clinico-pathologic and prognostic parameters. *World journal of surgical oncology* [Internet]. 2018 [Consultado 08 Marzo 2023]; 16(1), 118. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1425-3>
27. Laimer K., Spizzo G., Gastl G., Obrist P., Brunhuber T., Fong D., Barbieri V., Jank S., Doppler W., Rasse M., Norer B. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* [Internet]. 2007 [Consultado 8 Abril 2023]; 43:193–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16854613/>
28. Diniz M., García T., Antúnez J., Gándara M., & García A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases.* [Internet]. 2007 [Consultado 08 Abril 2023]; 13(3), 285–290. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01280.x>
29. Shahsavari F., Miri R., Ghorbanpour M. Expression of epidermal growth factor receptor in oral and esophageal squamous - cell carcinoma. *DRJ.* [Internet]. 2020 [Consultado 09 Abril 2023]; 17 (2), 85-91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7224265/>
30. Ryott M., Wngsa D., Heselmeyer K., Lindholm J., Elmberge G., Auer G., Aval E., Ried T., Munck E. EGFR protein overexpression and gene copy number increases in oral tongue squamous cell carcinoma. *HHS* [Internet]. 2009 [Consultado el 09 Abril 2023]; 45 (9). 1700-1708. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7294540/>
31. Bugshan A. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Research* [Internet]. 2020 [Consultado 10 Abril

2023]; 9, 229. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194458/>

32. Vos J., Elbers J., Krijgsman O., Traets H., Qiao X., van der Leun A., Lubeck Y., Seignette I-, Smit L., Willems S., van den Brekel M., Dirven R., Baris Karakullukcu M., Karssemakers L., Klop W., Lohuis P., Schreuder W., Smeele L., van der Velden L., Bing Tan I., Onderwater S., Jasperse B., Vogel W., Al-Mamgani A., Keijser A., van der Noort V., Broeks A., Hooijberg E., Peeper D., Schumacher T., Blank C., de Boer J., Haanen J., Zuur C. Neoadjuvant immunotherapy with nivolumab and ipilimumab induces major pathological responses in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Commun* [Internet]. 2021 [Consultado 12 abril 2023].12(1):7348. Disponible en: doi: 10.1038/s41467-021-26472-9. PMID: 34937871; PMCID: PMC8695578.