



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ALCOHOL Y DMBA
SOBRE LA EXPRESIÓN DE *erbB* EN UN MODELO DE
CARCINOGENÉISIS QUÍMICA ORAL EN HAMSTER SIRIO
DORADO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

CID SÁNCHEZ ORTIZ

TUTOR: Mtro. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN
ASESORES: DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO
ESP. ALEJANDRO MACARIO HERNÁNDEZ
DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

MÉXICO, D.F

2010

Estudio financiado por PAPIIT No IN228467-2 y IN226809-2



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.

AGRADEZCO:

A Dios por haberme permitido llegar a este día y por ayudarme a cumplir una de mis metas. Gracias.

A mis padres por todo el apoyo que me brindaron, por su infinito amor. Gracias los amo.

A mi tía Lulú por todo su apoyo y sus buenos consejos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología por darme tanto a todos mis profesores Gracias.

Al Dr. Luis Fernando Jacinto, al Dr. Juan Carlos Hernández, al Dr. Alejandro Macario, a la Dra. Dolores Jiménez, al Dr. Claudio Viveros por haberme ayudado en la elaboración de esta tesis y ser unas excelentes personas Gracias.

A todo el personal del laboratorio de inmunología Gracias.

A todos mis amigos de la facultad por todos los bellos momentos Gracias.

A Haidé por su ayuda, compañía. y cariño Gracias.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
Epidemiología	3
Características Generales	4
Características Clínicas	4
Características Radiográficas	4
Características Histológicas	5
Factores de Riesgo	6
Carcinogénesis	7
Procesos de Carcinogénesis Química	8
Receptores erbB	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
HIPÓTESIS	14
VARIABLES INDEPENDIENTES	14
VARIABLES DEPENDIENTES	15
MATERIALES y METODOS	15
Población	16
Inducción Química	16
Obtención de Muestras	17
Procesado de la Muestra	17
Análisis Inmunohistoquímico	18
RESULTADOS	21
Análisis Histológico	21
Análisis Inmunohistoquímico	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un problema de salud mundial asociado principalmente al tabaco y alcohol, reconocidas como cancerígenas, si actúan simultáneamente se potencializan. Se ha reportado que los receptores *erbB* están implicados en proliferación y angiogénesis además de sobreexpresar en el COCE, no obstante no se ha determinado su conducta ante la exposición al tabaco y alcohol.

Objetivos: Determinar la relación existente entre la exposición de alcohol y DMBA y la expresión de receptores *erbB* en un modelo hámster de carcinogénesis química oral.

Métodos: Cuarenta hámsters sirio dorado fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos: grupo control (A), grupo DMBA (B), grupo alcohol (C) y grupo alcohol y DMBA (D), al término de las 14 semanas los animales fueron sacrificados, disecando la mucosa de la bolsa del alimento para su análisis histopatológico e Inmunohistoquímico.

Resultados: Grupo A sin tumores, solo obtuvo mucosa normal, Grupo B se obtuvieron 3.28 tumores con volumen de 15.40 mm³, 4 displasias y 4 carcinomas bien diferenciados, la expresión de los receptores fue obtenida mediante análisis semicuantitativo, Grupo C no hubo lesión tumoral, se obtuvieron 5 mucosas normales y 5 hiperplasias, se mostró la expresión de los *erbB*, Grupo D se obtuvieron 2 tumores con volumen de 84.69 mm³, 2 displasias, 5 carcinomas bien diferenciados, 1 carcinoma moderadamente diferenciado y 1 carcinoma pobremente diferenciado, se identificaron los receptores. **Conclusiones:** en base a los resultados podemos decir que el DMBA induce desarrollo tumoral, que el alcohol es considerado como promotor, la inmunexpresión de los *erbB* dependerá del factor de riesgo y la condición histológica.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) ocupa uno de los diez primeros lugares dentro de todas las neoplasias a nivel mundial. Los factores de riesgo para el desarrollo del COCE son ambientales, genéticos y epigenéticos. Dentro de los factores ambientales podemos mencionar a los físicos (luz ultravioleta y radiación ionizante), químicos, (alcohol y tabaco) y biológicos (VPH y Epstein Barr). Los factores genéticos implican la mutación o falla de un protooncogen, asociado a la proliferación celular, tal como los receptores de factores de crecimiento. La familia erbB es una familia de receptores tirosina cinasa, que se encuentra asociado a la proliferación y diferenciación celular durante la embriogénesis y vida adulta. Cambios en su expresión se han relacionado con la transformación maligna. La exposición a factores exógenos como el tabaco y alcohol podrían promover cambios en la expresión de los miembros de la familia erbB. Su análisis y asociación con los factores de riesgo para el desarrollo del carcinoma oral de células escamosas podría aportar mayor información que reporta en medidas de prevención y tratamiento de esta neoplasia.

ANTECEDENTES

El carcinoma oral de células escamosas (COCE), es una neoplasia epitelial maligna invasiva, con diversos grados de diferenciación histológica y propensión a la pronta metástasis a ganglios linfáticos regionales. Ocurre predominantemente en adultos consumidores de alcohol y tabaco que se encuentran entre la quinta y sexta década de vida. ¹

Epidemiología

El cáncer es un problema a nivel mundial. Dentro de las neoplasias más frecuentes, el cáncer pulmonar ocupa el primer sitio seguido por el de mama. El cáncer oral ocupa el sexto lugar, se sabe que el COCE representa más del 70% del cáncer oral. ²

En el año 2002 el cáncer oral representó 274,000 casos. Dos tercios de estos casos fueron varones con factores de riesgo como tabaco y alcohol. Actualmente la mortalidad promedio del COCE es menor a la mitad de la incidencia marcada, sin embargo los diagnósticos de cáncer oral continúan siendo en etapas avanzadas, lo cual compromete la calidad de vida del paciente tratado.²

En el año 2001, en México registraron 102,657 tumores malignos, que corresponde a 101.6 casos por cada 100,000 habitantes, 34.8% fueron hombres y 65.2% fueron mujeres. Los estados con mayor número de casos registrados por cada 100,000 habitantes fueron Distrito Federal (273.9), Nuevo León (237.6) y Nayarit (104.8), los de menor tasa fueron el Estado de México (21.7) y Quintana Roo (25). Los principales tumores malignos registrados fueron de cuello de útero (24.4%), piel (13.6%), mama (11%), próstata (6%) y estómago (3%). El cáncer oral presentó 774 casos que correspondieron al 0.75% del total de los tumores.³

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Características clínicas

La mayoría de los pacientes con COCE no presentan síntomas en etapas iniciales, no obstante, en algunos pacientes se pueden presentar síntomas vagos y hallazgos físicos mínimos, como lesiones blancas en forma de placas, agrandamiento en la mucosa y ulceración.^{4, 5, 7}

El paciente que presenta COCE en lengua, puede referir dolor o crecimiento infiltrativo o exofítico. El carcinoma de piso de boca se puede presentar como masa papilar blanquecina, que puede invadir base de lengua. En la zona de paladar duro la neoplasia puede adoptar un aspecto ulcerado y/o verrugoso a menudo rodeado por área leucoplásica.³⁰ El carcinoma de labio suele comenzar como una zona elevada eritroplásica, que cambia a leucoplásica o mixta con ulceraciones no cicatrizantes.³¹

Características radiográficas

Los hallazgos radiográficos ocurren en la mitad de los casos de COCE, se caracterizan por bordes mal definidos y sin cortical, en algunas ocasiones los límites aparecen suavemente delimitados, indicando una erosión subyacente; si existe fractura se pueden ver bordes afilados, en carcinomas que no infiltran hueso se observa una zona radiolúcida sobre la superficie ósea, indicando erosión por la presión superficial.⁶

Características histológicas

Las características histológicas comúnmente presentadas por el COCE son: pérdida de la membrana basal y de la arquitectura del estrato basal del epitelio, mayor número de mitosis y sustitución de células basales por células con citoplasma irregular y alargado que invaden el tejido conjuntivo subyacente en forma aislada conglomerados o islas de células.¹

La Organización Mundial de la Salud (OMS), postuló una clasificación histológica en base a la diferenciación, considerando al pleomorfismo celular, queratinización y número de mitosis para establecer la gradificación:³²

Grado 1 ó bien diferenciado: Presenta múltiples perlas córneas e importante queratinización celular en un 75% de la población celular, con puentes intercelulares; menos de 2 mitosis por campo óptico de 40X, con rara presencia de mitosis atípicas y pleomorfismo celular y nuclear reducido.

Grado 2 ó moderadamente diferenciado: Menor presencia de perlas córneas y queratinización individual en un 25-75%, no se observan puentes intercelulares, de 2 a 4 mitosis por campo óptico de 40X, con mayor presencia de mitosis atípica, el pleomorfismo celular y nuclear es moderado.

Grado 3 ó pobremente diferenciado: Ausencia de perlas córneas y queratinización individual, no se observan puentes intercelulares, más de 4 mitosis por campo óptico de 40X, frecuentes mitosis atípicas y pleomorfismo celular y nuclear pronunciado.

Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo del COCE son ambientales, genéticos y epigenéticos.

Actualmente se acepta que la mayoría de las neoplasias resultan de un proceso de múltiples pasos, por la acumulación de alteraciones genéticas derivadas de la exposición a factores exógenos que conducen a la formación y acción de oncogenes y la pérdida de dos o más genes supresores tumorales.^{4, 20}

Dentro de los factores de riesgo exógenos más frecuente asociados al COCE podemos encontrar a factores físicos (luz UV) biológicos (VPH, VEB) y químicos (alcohol y tabaco), siendo estos últimos los de mayor frecuencia, ya que un alto porcentaje de los pacientes con COCE reportan antecedentes de ellos.^{4,5}

Se ha demostrado que el consumo de tabaco puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer. Dentro de los componentes del tabaco se encuentra el hidrocarburo aromático policíclico llamado Dimetilbenzantraceno (DMBA) que es un químico altamente corrosivo flamable e insoluble al agua, en su estado químicamente puro se utiliza como reactivo de laboratorio, para la elaboración de otros compuestos orgánicos como N-nitrosoaminas, nicotina y nitrosonornicotina.³³ El DMBA es considerado un carcinógeno, pues a exposiciones prolongadas puede provocar mutaciones en el ADN induciendo lesiones crónicas en pulmones y cavidad oral que concluye en neoplasias.

Otro factor de riesgo para el COCE es el alcohol el cual es considerado un potente carcinogénico y promotor de tumores. El alcohol se puede metabolizar químicamente a acetaldehído, los órganos afectados son glándula mamaria, esófago, estómago, intestino delgado, hígado, riñón y pulmón. El alcohol se concentra en saliva y altera el metabolismo por medio de oxidación, el acetaldehído interfiere en la reaparición y síntesis del ADN. Se ha demostrado en estudios in vitro que el acetaldehído causa anomalías citogenéticas y mutaciones en hipoxantina fosforibotransferasa causando alteraciones estructurales y funcionales, formando aductos con ADN derivados de la reacción de guanosina, lo cual induce carcinogénesis.²⁹

Carcinogénesis

La carcinogénesis es el mecanismo a través del cual se desarrolla una neoplasia.¹⁰

La carcinogénesis puede ser unifactorial, es decir, que la causa un solo carcinógeno o un solo factor o multifactorial que ocurre por varios factores o carcinógenos que actúan simultáneamente y/o secuencialmente. Esta última es la más común en el desarrollo de las neoplasias.⁸

La carcinogénesis multifactorial es dividida, en:

Sincarcinogénesis: desarrollada por 2 o más carcinógenos y éstos se potencializan uno con otro.

Cocarcinogénesis: es el tipo de carcinogénesis que se desarrolla por un iniciador y un promotor que por sí solos no tienen la capacidad de desarrollar una neoplasia.^{8,9,10}

La carcinogénesis también puede ser clasificada según la naturaleza del carcinógeno, esta puede ser: física, biológica y química la carcinogénesis oral esta relacionada ampliamente al uso de alcohol y tabaco es decir compuestos químicos.

La carcinogénesis química se caracteriza por la exposición a ciertas sustancias químicas, que son capaces de inducir cáncer directamente o con mayor frecuencia después de su activación metabólica. En este sentido los carcinógenos pueden ser divididos en directos e indirectos. Los carcinógenos de acción directa son lo suficientemente reactivos por sí mismos, como para establecer enlaces covalentes con las macromoléculas celulares como ácidos nucleicos estos son: tioacetamida hidracinas y alcaloides. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados originalmente de alquitrán de hulla tales como el benzopireno, metilcolantreno, dibenzantraceno y DMBA, se metabolizan por acción de las oxidasas de función mixta dependiente del citocromo p450, lo cual les proporciona el potencial de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, formando productos de adición o aductos, promoviendo mutaciones que favorezcan la formación neoplásica.^{9, 24}

Para su estudio la carcinogénesis puede ser dividida en etapas: iniciación, promoción, transformación y progresión.¹¹

Proceso de la carcinogénesis química

La iniciación o activación del tumor empieza cuando el ADN de la célula o de una población de células se daña por la exposición a factores carcinogénicos exógenos o endógenos; la sensibilidad de las células mutadas respecto a su microambiente puede alterarse, lo cual podría favorecer un crecimiento más rápido en estas, comparado con las células no alteradas.¹¹

La promoción tumoral se caracteriza por una expansión clonal selectiva de las células iniciantes, como resultado de la expresión alterada de los genes responsables de la proliferación.¹¹

La transformación es el cambio de una célula precancérgena a una cancerígena, debido a la adquisición de un fenotipo y genotipo maligno, el cual se sustenta en los eventos anteriores.¹¹

La progresión se da cuando células cancerígenas han acumulado mutaciones que las hacen crear una población neoplásica, con alteraciones en los oncogenes, genes supresores de tumores, genes reparadores de ADN, etc. Formando así la neoplasia.¹¹

El uso de modelos animales experimentales que representen los cambios celulares y moleculares, asociados con la iniciación y progresión del COCE, es de crucial importancia. El hámster sirio es el modelo de carcinogénesis oral más conocido, por relacionarse estrechamente al desarrollo de lesiones premalignas y malignas de carcinogénesis oral. El establecimiento de sistema experimental de carcinogénesis química inducida por sustancias como benzopireno, nitrosaminas o dimetil benzoantraceno (DMBA), ha otorgado la posibilidad de obtener lesiones para su estudio. Este modelo es universalmente utilizado para estudios de cáncer bucal, ya que aprovecha la particularidad anatómica del hámster: un bolsillo de alimento situado en el espesor de la mejilla, el cual se encuentra cubierto por una mucosa. Esta estructura que los hámsters utilizan fisiológicamente para el transporte de alimentos secos, se puede cancerizar mediante la aplicación tópica de cancerígenos químicos que actúan sobre toda la superficie de la mucosa. Con gran reproducibilidad se producen en el modelo lesiones premalignas y malignas muy similares a las de la boca humana.^{23, 26}

Receptores erbB

Dentro de los eventos moleculares más frecuentes asociados al desarrollo neoplásico se han reportado autosuficiencia de señales proliferativas, la inactivación de genes supresores, adquisición del potencial ilimitado de replicación, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis y potencial metastásico y activación de oncogenes.²⁵

Diversos estudios indican que los oncogenes son los genes que colaboran en la transformación maligna celular, prioritariamente a través de la promoción de la proliferación celular aberrante, evitando la apoptosis celular o del establecimiento de mecanismos de supervivencia celular en condiciones adversas.²¹

El oncogén expresa una proteína anormal denominada oncoproteína, la cual puede mantenerse activa independientemente de las señales reguladoras. Dentro de los distintos tipos de oncogenes se encuentran factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, proteínas citoplasmáticas transductoras de señales, factores de transcripción y proteínas responsables de la activación del ciclo celular.^{4,5}

La familia de genes *erbB* codifica para receptores de factores de crecimiento epitelial. Tiene cuatro miembros llamados *erbB1/HER1*, *erbB2/Neu/HER2*, *erbB3/HER3* y *erbB4/HER4*.

Los receptores *erbB* son tipo tirosina cinasa, se activan por homodimerización y/o heterodimerización, promovida por la unión a ligandos o por una elevada densidad del receptor debida a su sobreexpresión. La activación por dimerización conduce a la autofosforilación del dominio intracelular tirosina cinasa del receptor, lo que a su vez provoca un reclutamiento y activación de vías de señalización intracelular que participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular.

Reportes indican que erbB1 se encuentra implicado en el carcinoma oral de células escamosas, al promover mayor proliferación tumoral e inducir la expresión de moléculas relacionadas con angiogénesis. Este receptor está más involucrado con los componentes del tabaco según reportes afecta a myc y H-ras.³⁵

El erbB2 normalmente es un receptor implicado en el desarrollo embrionario y en el desarrollo de tejido nervioso, la participación de este receptor en el COCE tiene como finalidad la potencialización de vías de señalización mediante la activación de Jak2 lo cual potencializa la vía de señalización tirosina cinasa asociada a proliferación.^{16, 22}

Por otro lado erbB3 es activado por heterodimerización y su función principal en concentraciones normales es regular el ciclo y diferenciación celular. Se considera que este receptor activa a erbB-2 induciendo la transducción de la vía PI3K para promover la proliferación tumoral, así como inhibir la apoptosis.^{18, 19}

El receptor erbB4 generalmente es asociado a carcinomas de células escamosas, su expresión se ve involucrada en la transcripción y regulación de proteasas y citocinas implicadas en la angiogénesis, proliferación e invasión celular.^{18 19 20}

Las investigaciones de éstos en los últimos años han mostrado las aplicaciones y utilidades en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de pacientes con cáncer, sin embargo aún no se ha establecido la relación de éstos con el COCE inducido por alcohol e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El carcinoma oral de células escamosas es actualmente un problema de salud pública, que involucra distintos factores de riesgo ampliamente distribuidos (alcohol y tabaco). El tabaco puede provocar el desarrollo de lesiones con cierto grado de displasia, así mismo, el consumo de alcohol causa cambios en las células al ser metabolizado en acetaldehído, provocando eventos carcinogénicos, ambos factores pueden sinergizar. Estos dos factores de riesgo cada vez son más frecuentes en las poblaciones jóvenes, creando un ambiente de mayor exposición y riesgo para desarrollar enfermedades crónicas y neoplasias como el COCE.

Investigaciones han demostrado la asociación del desarrollo neoplásico con los receptores erbB, considerándolos como uno de los componentes principales en la transformación maligna. La sobreexpresión y/o mutaciones de estos receptores pueden ser asociados a diferentes conductas biológicas, como agresividad, supervivencia y/o tratamiento en el paciente oncológico, sin embargo, aún no se ha establecido cuál es la relación y conducta de estos receptores ante la exposición al alcohol e hidrocarburos aromáticos policíclicos como el DMBA (componente del tabaco), considerados factores de riesgo importantes en el desarrollo del COCE.

El establecimiento del o los patrones de estas moléculas nos ayudaría a incrementar el conocimiento y aplicaciones en el área de la oncología oral.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el tabaco y el alcohol son hábitos comunes en la mayoría de las sociedades, son considerados un problema de salud mundial, principalmente por los efectos nocivos ocasionados, tal como el incremento en el desarrollo de neoplasias.

Sin embargo, a pesar de contar con un largo tiempo de ser reconocidos como carcinógenos, aún no se ha determinado completamente cuáles son los cambios particulares sobre los puntos o el proceso de la transformación maligna, como lo son los receptores erbB. Estos receptores son considerados unos de los principales efectores en la transformación maligna debido a que participan en eventos de proliferación, inhibición de apoptosis e invasión de células transformadas.

Por lo que el determinar cuál es la relación de los factores de riesgo como el alcohol y tabaco y la expresión de los miembros de la familia erbB en la carcinogénesis, podría beneficiar a futuro áreas tales como el pronóstico y tratamiento del COCE, fenotipicar y establecer esta relación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación existente entre la exposición de DMBA y Alcohol, con la expresión de receptores *erbB* en el proceso de transformación neoplásica en el modelo hámster en carcinogénesis química oral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto del alcohol y DMBA sobre el volumen tumoral.

Determinar el efecto del alcohol y DMBA sobre el grado de diferenciación histológico del COCE.

Determinar el nivel de expresión de los receptores *erbB* en hámsters expuestos a DMBA y alcohol.

HIPÓTESIS

La exposición a DMBA y alcohol promoverá e inducirá el desarrollo de COCE que sobreexpresa a los receptores *erbB*.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Grado de diferenciación histológica (normales, hiperplasia, displasia ó carcinoma).

Volumen del tumor (mm³).

VARIABLES DEPENDIENTES

Expresión de receptores erbB $\mu\text{g}/\mu\text{m}^2$ IHQ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Micropipetas ajustables Eppendorf.

Puntas para micropipeta Cole-parmer.

Tubo para centrífuga de 2.0 ml Eppendorf.

Portaobjetos silanizados.

Portaobjetos normales Rounden-corner Slides.

Aceite de inmersión.

3 (Trimethoxysilyl) propyl methacrylate.

Vasos de precipitados de vidrio.

Matraz Elenmeyer.

Vasos Köplin de plástico.

Probetas de vidrio.

Cámara Olympus C-3040 (Tokio Japón).

Microscopio Óptico Olympus BX 40.

Anticuerpos.

- -erbB1 (sc-03).
- -erbB2 (sc-7301).
- -erbB3 (sc-285)
- -erbB4 (sc-283).

PBS 0.1 M, Ph 7.2.

7, 12 Dimethyl benz (a) anthracene DMBA (D3254-10MG).

Etanol.

Agua destilada.

Hematoxilina de Harris.

Resina de montaje hidrofóbica en Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania).

Lápiz hidrofóbicos (Dako Cytomation Pen).

Población

Se trabajó con una población de 40 hamsters sirio dorado, del bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM. Que se dividieron en 4 grupos para la realización del estudio, el control (1), el grupo de DMBA (2), el grupo de alcohol (3) y el grupo de alcohol / DMBA (4).

Inducción química

El grupo control recibió agua purificada ad libitum y aceite mineral en carrillo derecho.

Al grupo 2 se le administró DMBA usando como vehículo aceite mineral a la concentración de 0.5%, para así mantenerlo mayor tiempo en la bolsa de alimento del hámster, esto se realizó sedando al hámster por inhalación de cloroformo, el compuesto fue colocado con un pincel fino (#4) en la bolsa de alimento de lado derecho.

Al grupo 3 se le administró alcohol a través del agua de consumo ad libitum en concentración del 15%.

Al grupo 4 se le administró alcohol y DMBA simultáneamente como se ha descrito antes.

Los cuatro grupos fueron inducidos durante 14 semanas.

Obtención de muestras

De los cuatro grupos se obtuvieron 40 muestras de bolsa de hámster de lado derecho, las cuales se obtuvieron a través de disección quirúrgica. El tamaño tumoral se obtuvo con la siguiente fórmula ($VT = a \times b^2 \times 0.52$; donde a = diámetro mayor, b = diámetro menor perpendicular al a).

Procesado de la muestra

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y se deshidrataron con alcoholes porcentuales en forma ascendente, del 50 al 100% durante 60 minutos en cada uno, para la inclusión en parafina y realizar los cortes seriados de $4\mu\text{m}$, se efectuaron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), su análisis histológico fue con ayuda de un Patólogo Bucal, usando la siguiente gradificación (normal, hiperplasia, displasia ó carcinoma).

Inmunohistoquímica

Las muestras obtenidas se procesaron por el método convencional de inmunohistoquímica, usando los anticuerpos erbB1, erbB2, erbB3 y erbB4 que consta de los siguientes pasos.

Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido será a través de baños en xilol/alcohol a diferentes tiempos, lavado con buffer de fosfato, pH 7.4 PBS, recuperación antigénica a través de buffer de citrato 0.1M, Ph 6 a 100°C . dejar enfriar a temperatura ambiente o sumergirlo en agua fría 10 minutos, enjuague con PBS. Eliminación de peroxidasa inmersión 10 minutos en H_2O_2 al 3% y enjuague con PBS, inmersión en solución de albúmina 2% durante 20 minutos y enjuague con PBS,

inmersión en solución de Tritón al 0.2% durante 20 minutos y enjuague con PBS, incubación con anticuerpos primarios erbB1 SC-03 rabbit polyclonal santa cruz, erbB2 SC-7301 mouse monoclonal santa cruz, erbB3 (c-17) rabbit polyclonal santa cruz y erbB4 (c-18) rabbit polyclonal santa cruz, dilución en PBS de (1:100) toda la noche a 4°C. Enjuague con PBS e incubación del anticuerpo secundario biotinilado (biotinylated link universal) dilución en PBS durante una hora. Enjuagar con PBS y revelado con DAB (Dako 346811 Noth América, Inc. Carpinteria CA). Deshidratación a través de baños de alcohol/xilol a diferentes tiempos y contratinción con hematoxilina de Gill. Enjuagar con agua dentro de un Köplin limpio (dos veces). Colocar el cubre objetos con resina y Limpiar el exceso de xilol.

Análisis Inmunohistoquímico

Los resultados se analizaron a través del método semicuantitativo de inmunohistoquímica, por medio de un software de cuantificación Image lab (MCM DESIGN Denmark Copyright © 1998-2009). El cual nos permitirá determinar la densidad óptica ($uo/\mu m^2$) a través de medición RGB de cada célula positiva, las microfotografías fueron analizadas usando un microscopio óptico Olympus xb40®. Para cada caso la cuantificación de inmunotinción fue hecha por dos métodos: ayuda de computadora análisis de imagen y digital semicuantitativo.

De cada muestra se tomaron microfotografías de los pixeles 640x480, fueron obtenidos de campos consecutivos en el objetivo 40x de 200 x 200 μm , con cámaras digitales de Olympus C 3040® ajustadas a estos parámetros. Las imágenes obtenidas se analizaron por el sistema de proceso y análisis de proyección de imagen, Image lab® (MCM Desing 2.2.4), ajustado a la escala micrométrica (μm).

Tres parámetros fueron obtenidos con el programa Image lab®: (1) porcentaje de células marcadas; (2) intensidad inmunotinción digital y (3) índice digital de la expresión.

El porcentaje de células marcadas (PCM) del tumor de origen epitelial para cada caso, fueron contadas por el Image lab®, mientras que el observador las clasificó como células positivas o negativas.

$$\text{PCM} = \frac{\text{número de células etiquetadas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100 = \%$$

Image lab® fue utilizado para cuantificar la intensidad del color. Para cada caso, las microfotografías usadas para determinar el PCM fueron consideradas. El promedio de la densidad óptica de estas áreas fue calculado automáticamente y representa el promedio de color rojo, verde y azul (RGB), por el área del citoplasma a analizar, expresado en unidades ópticas por el micrómetro ajustado ($\text{ou}/\mu\text{m}^2$), el mismo procedimiento fue aplicado para obtener la densidad óptica de fondo (DOF) de un área, sin el tejido o espacio vascular para cada fotomicrografía. El color blanco absoluto que corresponde al máximo de la densidad óptica del fondo ($3207 \text{ ou}/\mu\text{m}^2$), es compuesto por la totalidad de rojo, de verde y azul; el negro es ausencia de estos colores. Por lo tanto, los valores de densidad óptica calculados por el programa, componen una escala en la cual los valores elevados corresponden a los colores que están claros. Para determinar la intensidad de inmunoexpresión digital (DOF) se uso la siguiente fórmula:

$$I_{\text{dig}} = 320.7 - \frac{320.7 \times \Sigma \text{DO}}{\Sigma \text{DOF}} = \text{Lou}/\mu\text{m}^2$$

El índice digital de la expresión (IE_{dig}) fue obtenido por la multiplicación del PCM por la I_{dig} para cada caso.

$$IE_{\text{dig}} = \text{PCM} \times I_{\text{dig}} = \text{Lou}/\mu\text{m}^2$$

100

RESULTADOS

La población final consistió en 37 hámster sirios, debido a disputas territoriales 3 animales fallecieron.

El grupo control no presentó ningún tipo de lesión, el grupo B presentó en promedio 3.28 tumores, con volumen tumoral de 15.40 mm³ el grupo C no presentó ningún tipo de lesión y el grupo D en promedio presentó 2 tumores con un volumen tumoral de 84.69 mm³ (TABLA 1).

Grupo	Promedio Tumores	Volumen Tumoral (mm ³)
A (Control)	0	0
B (DMBA)	3.28	15.40mm ³
C (OH)	0	0
D (DMBA-OH)	2	84.69mm ³

Análisis Histológico

En el grupo control se obtuvo tejido sano, no hubo presencia de ningún tipo de lesión, en el grupo B tratado con DMBA, se obtuvieron 4 displasias severas y 4 carcinomas bien diferenciados, en el grupo C tratado con OH, se obtuvieron 5 hiperplasias y 5 mucosa histológicamente sanas y en el grupo D tratado con DMBA y OH se obtuvieron 2 displasias, 5 carcinomas bien diferenciados, 1 carcinoma moderadamente diferenciado y 1 carcinoma pobremente diferenciado (Fig. 1).

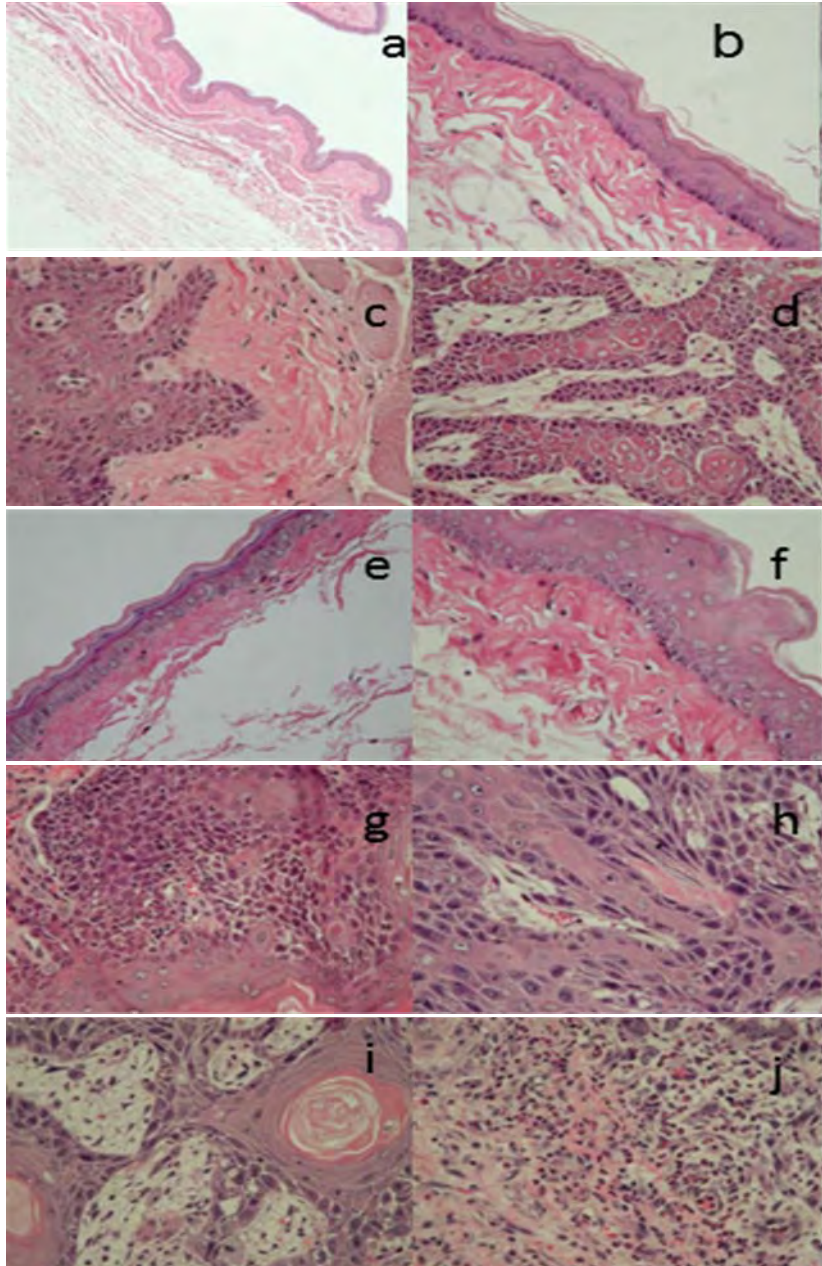


Fig. 1 a) mucosa normal 10X grupo, b) mucosa normal
 c) displasia severa , d) carcinoma bien diferenciado, e) mucosa normal, f) hiperplasia, g) displasia severa, h) carcinoma bien diferenciado, i) carcinoma moderadamente diferenciado, j) carcinoma pobremente diferenciado (b-j 40X)

Análisis Inmunohistoquímico:

La expresión de erbB1 en el grupo A indico una expresión digital de $101.26\text{uo}/\mu\text{m}^2$, en el grupo B la expresión en las displasias severas fue de $49.42\text{uo}/\mu\text{m}^2$, no así en los carcinomas bien diferenciados que expresaron $91.03\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2c), en el grupo C en mucosa normal la expresión fue de $98.33\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2d) y en hiperplasia la expresión fue de $59.54\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2e), en el grupo D la expresión fue $108.22\text{uo}/\mu\text{m}^2$ en displasia severa (Fig. 2f), $18.13\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2g) en carcinomas bien diferenciado, de $100.19\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2h) en carcinoma moderadamente diferenciado y en el carcinoma pobremente diferenciado la expresión fue de $63.25\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Tabla 2).

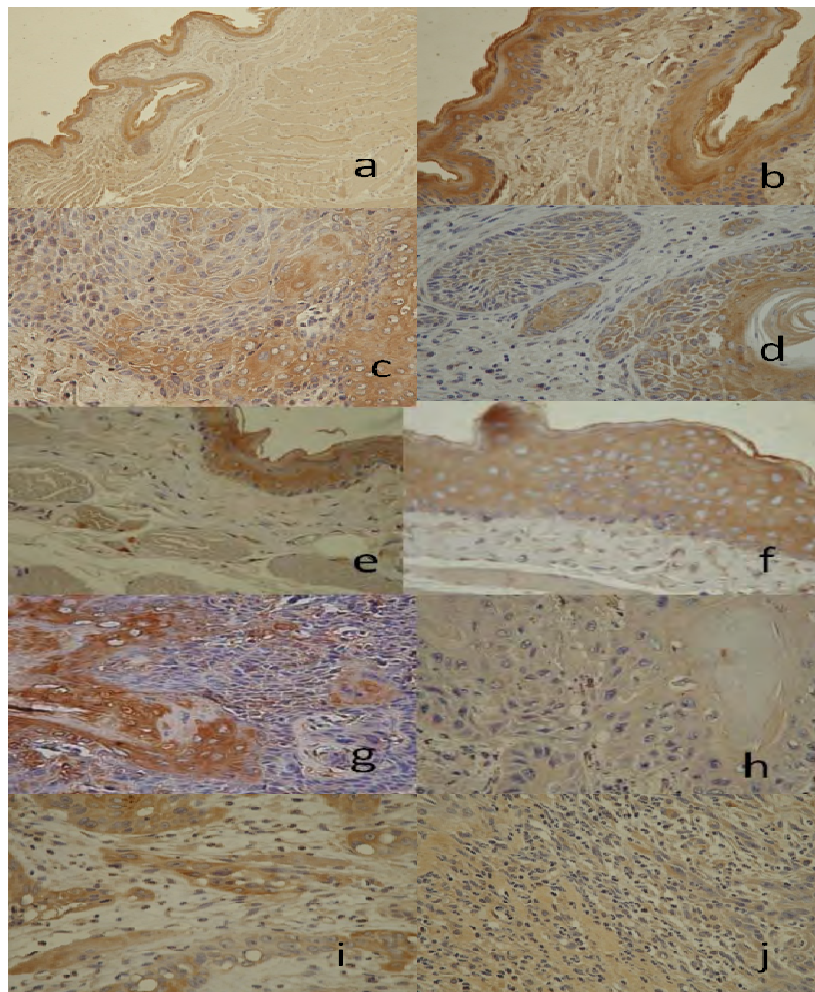


Fig. 2. Expresión de erbB1. a) mucosa normal 10X. b) mucosa normal, c) displasia, d) carcinoma bien diferenciado, e) mucosa normal, f) hiperplasia g) displasia, h) carcinoma bien diferenciado, i) carcinoma moderadamente diferenciado, j) carcinoma pobremente diferenciado (b-j 40X)

La expresión de erbB2 en el grupo A indico $19.54 \text{uo}/\mu\text{m}^2$, en el grupo B la expresión fue de $51.03 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 3c) en displasia severa, en carcinoma bien diferenciado fue $91.03 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.3d), en el grupo C la expresión $82.67 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.3e), en mucosa sana y en hiperplasia fue $156.97 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.3f), en el grupo D la expresión de displasia severa fue de $51.03 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.3g) en carcinoma bien diferenciado fue $78.99 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.3h), en carcinoma moderadamente diferenciado fue $89.43 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 3i) y en carcinoma pobremente diferenciado (Fig.3j) fue $102.49 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Tabla 2).

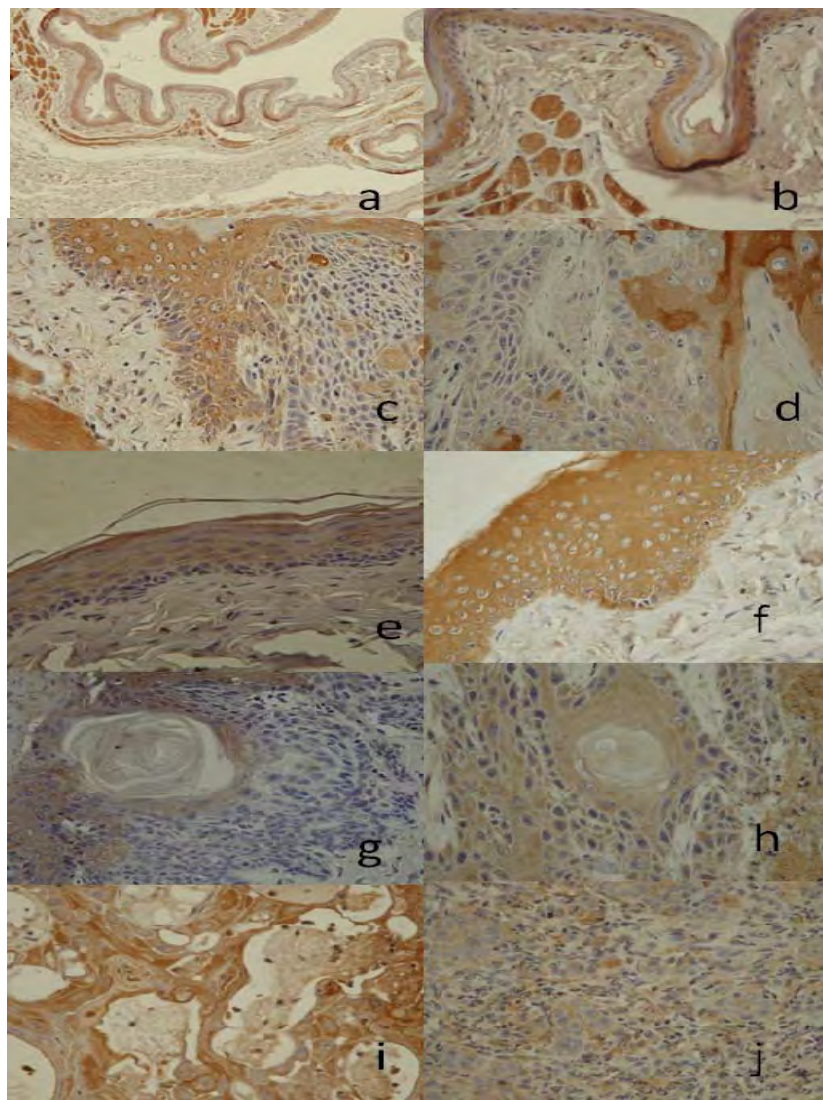


Fig. 3. Expresión de erbB2. a) mucosa normal 10X, b) mucosa normal, c) displasia, d) carcinoma bien diferenciado, e) mucosa normal, f) hiperplasia, g) displasia, h) carcinoma bien diferenciado, i) carcinoma moderadamente diferenciado, j) carcinoma pobremente diferenciado (b-j 40X)

La expresión de erbB3 en el grupo A fue de 29.50 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ en mucosa sana, en el grupo B la expresión fue de 104.86 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4c) en displasia severa, en carcinoma bien diferenciado fue de 117.81 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4d), en el grupo C la expresión fue de 91.51 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4e) en mucosa sana y en hiperplasia fue de 100.53 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4f), en el grupo D la expresión fue de 104.86 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4g) en displasia severa, en carcinoma bien diferenciado fue 137.39 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4h), en carcinoma moderadamente diferenciado fue de 94.24 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4i) y en carcinoma pobremente diferenciado fue de 8.57 $\text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4j) ver tabla 2.

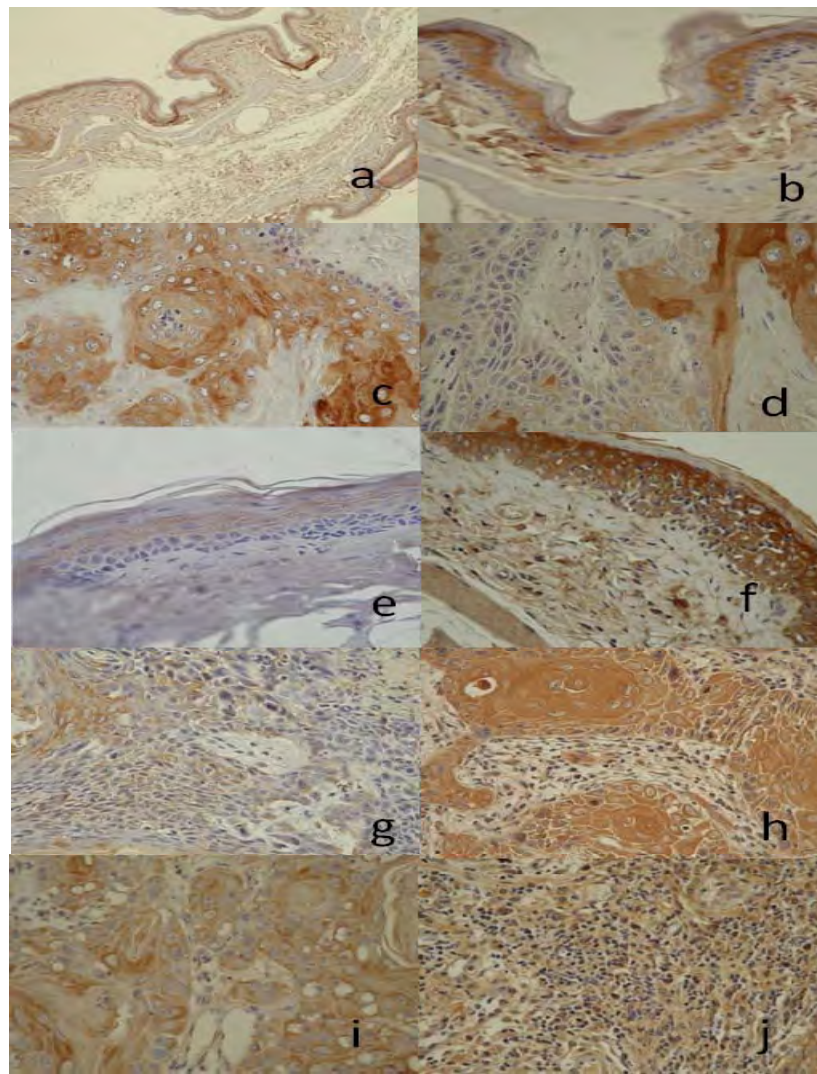


Fig. 4. Expresión de erbB3. a) mucosa normal 10X. b) mucosa normal, c) displasia, d) carcinoma bien diferenciado, e) mucosa normal, f) hiperplasia, g) displasia, h) carcinoma bien diferenciado, i) carcinoma moderadamente diferenciado j) carcinoma pobremente diferenciado (b-j 40X)

La expresión de erbB4 en el grupo A fue de $63.72 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$, en el grupo B la expresión fue de $90.04 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5c), para displasia severa, para carcinoma bien diferenciado fue de $98.73 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5d), la expresión en el grupo C fue de $150.65 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5e) en mucosa sana y en hiperplasia fue de $99.53 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5f), en el grupo D la expresión fue de $90.04 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ en displasia severa (Fig. 5g) en carcinoma bien diferenciado $155.82 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5h), en carcinoma moderadamente diferenciado fue de $87.38 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5i) y en carcinoma pobremente diferenciado fue de $83.69 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 5j) ver tabla 2.

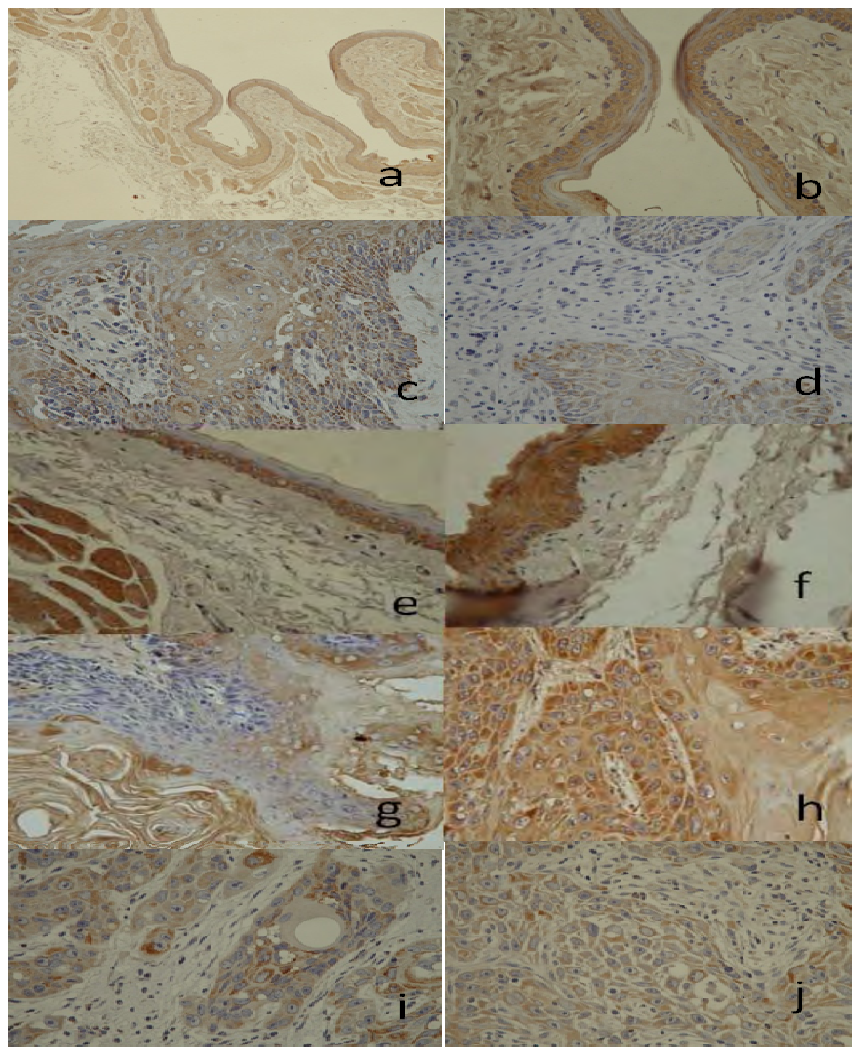


Fig. 5. Expresión de erbB4. a) mucosa normal 10X. b) Mucosa normal, c) displasia, d) carcinoma bien diferenciado, e) mucosa normal, f) hiperplasia, g) displasia, h) carcinoma bien diferenciado, i) carcinoma moderadamente diferenciado, j) carcinoma pobremente diferenciado (b-j 40X).

Tabla 2. Expresión digital de los receptores por grupo y por lesión.				
Grupo A. Control				
Lesión	erbB1	erbB2	erbB3	erbB4
Normal	Edig =101.26	Edig =19.54	Edig =29.50	Edig =63.72
Grupo B. DMBA 0.5%				
Displasia severa	Edig = 49.42	Edig =51.03	Edig =104.86	Edig =90.04
COCE BD	Edig =91.03	Edig =60.35	Edig = 117.81	Edig =98.73
Grupo C. OH 15%				
Normal	Edig =98.33	Edig = 82.67	Edig =91.51	Edig =150.65
Hiperplasia	Edig =59.54	Edig =156.97	Edig =100.53	Edig =99.53
Grupo D. DMBA 0.5%/ OH 15%				
Displasia severa	Edig =108.22	Edig =46.07	Edig =34.1	Edig =52.46
COCE BD	Edig =18.13	Edig =78.99	Edig =137.39	Edig =155.82
COCE MD	Edig =100.19	Edig =89.43	Edig =94.24	Edig =87.38
COCE PD	Edig =63.25	Edig =102.49	Edig =8.57	Edig =83.69

DISCUSIÓN

El carcinoma oral de células escamosas es una neoplasia asociada con factores de riesgo tales como alcohol y tabaco. Reportes indican que ante la exposición a estos factores, el riesgo relativo de desarrollar un COCE se incrementa en un 75%.¹ El alcohol es metabolizado a acetaldehído, el cual es considerado como carcinógeno, es un potente creador de radicales libres según Helmut K y Stickel Félix. Esto promueve mutaciones en bases nitrogenadas y una síntesis de proteínas erróneas.²⁹

Se ha estimado que el tabaquismo es un hábito productor de exposiciones a diferentes hidrocarburos aromáticos policíclico, entre ellos se encuentra el DMBA; el cual se incorpora fácilmente al ambiente, ya que se encuentra en los gases de vehículos de combustión interna y es metabolizado por el citocromo p450 generando sitios de epóxidos con material genético.³⁴

Marx R. ha demostrado que el consumo sinérgico de alcohol y tabaco promueve mayor número tumoral o mayor crecimiento.³⁴

En este estudio observamos que el promedio tumoral para el grupo DMBA fue de 3.28 tumores y el volumen tumoral fue de 15.40mm³. Zheng Sun, determino que con seis semanas de exposición tópica a DMBA al 0.5% puede inducir un desarrollo tumoral.⁴⁹

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los grupos B y D, indicando que el DMBA es un inductor tumoral, sin embargo, debido a un mayor tiempo de exposición nosotros logramos desarrollar tumores mayores. Así mismo, el volumen del grupo D fue mayor que el del grupo B. Esto puede ser debido a la capacidad promotora del alcohol. Como ya se ha mencionado un promotor se define como aquel compuesto químico capaz de causar la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes

promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares. Por lo tanto, su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada a través de receptores específicos, esta definición se valida al observar los resultados del grupo C donde no se obtuvo desarrollos tumorales solo hiperplasias y especímenes histológicamente normales.

Para poder establecer un diagnóstico definitivo de carcinoma, el análisis histológico es considerado el estándar de oro. Se ha demostrado que una de las características importantes en la transformación maligna es la presencia de displasia, ya que esta puede promover el desarrollo neoplásico dependiendo del grado (pobre, moderada y severa).^{37, 38} Las displasias moderadas y severas según Warnakulasuriya S. son las de mayor riesgo para el desarrollo de un carcinoma en un 36%.^{37,47} En este estudio se observó que el grupo sometido a DMBA desarrollo displasia severa y carcinoma bien diferenciado, el grupo sometido a OH solo desarrollo hiperplasias y el grupo de DMBA/OH desarrollarlo displasia, carcinoma bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

Actualmente se sabe que la carcinogénesis es un proceso complejo que involucra la interacción de factores extrínsecos e intrínsecos, tales como moléculas importantes en la proliferación celular.^{10,11,24} Este es el papel de los receptores erbB que han sido implicados en el desarrollo neoplásico, incluyendo al COCE.³⁹ Se sabe que erbB1 esta implicado en funciones como la angiogénesis y potencialización de vías de señalización como la PI3K.³⁵ erbB2 esta implicado en el desarrollo embrionario y de tejido nervioso y la activación a Jak2 lo cual potencializa las vías de señalización tirosina cinasa asociadas a proliferación.^{16, 22} De erbB3 se sabe que esta implicado en la activación de

erbB-2, induce la transducción de la vía PI3K para promover la proliferación tumoral e inhibe la apoptosis.^{18,19} La expresión de erbB4 se ve involucrada en la transcripción y regulación de proteasas y citocinas implicadas en la angiogénesis, proliferación e invasión celular.^{18,19,20}

La expresión de los receptores en la mucosa histológicamente normal del grupo C, fue para erbB1 hubo una disminución, mientras que erbB2, erbB3 y erbB4 se incremento con respecto al control. Este dato nos indica que el alcohol tiene un efecto sobre la mucosa histológicamente normal, aun cuando no pueda ser visto microscópicamente. Se ha demostrado que la exposición crónica a alcohol puede promover a un principio estados de estrés.⁴¹ Sin embargo en base a nuestros resultados del grupo C observamos que algunas mucosas presentaron desarrollo hiperplásico, mostrando un patrón de expresión similar que las mucosas histológicamente sanas. Los cambios proliferativos podrían ser asociados a otras vías o cambios de señalización intracelular, así como al grado de susceptibilidad del individuo. Según Zima y Kalousova el alcohol participa en la cascada de señalización, aunque esto es poco conocido se sabe que afecta a MAPK que tiene un papel esencial en proliferación y diferenciación celular.^{29, 40, 41 42, 44}

Para las displasias del grupo B, la expresión de erbB1 con respecto al control se observó disminuida, no siendo así para los receptores erbB2, erbB3 y erbB4 que incrementaron su expresión. En las displasias del grupo D, solo erbB1, erbB2 y erbB3 incrementaron su expresión. Este cambio en el patrón de expresión en dos condiciones histológicas similares puede ser atribuido al factor de riesgo expuesto. La expresión de

los receptores erbB puede modificarse dependiendo la condición histológica del tejido.^{45, 48}

La expresión de los erbB en los carcinomas bien diferenciados del grupo B y D indicó conducta diferente en erbB1, no obstante, erbB2, erbB3 y erbB4 mostraron incremento, principalmente en erbB2 y erbB3 en el grupo D. El efecto aditivo del OH en el grupo D indica que estos carcinomas tendrán una conducta diferente en base a la expresión de erbB1, erbB2 y erbB3, principalmente por estos dos últimos. Aurore Toullec y Eleftherios Vairaktaris indican que la sobreexpresión de erbB2 y erbB3 favorece mayor agresividad y pobre pronóstico⁴⁶.

La expresión de los receptores en el carcinoma moderado y pobremente diferenciados respecto al control indicó aumento en la expresión de erbB2 y erbB4, no así para erbB1 y erbB3 que mostraron conducta heterogénea. Esto indica que para una mayor agresividad se ven favorecida las vías de señalización activadas por erbB2 y erbB4. Peter H y Yang Ya indican que la expresión erbB2 en condiciones neoplásicas favorece la activación a Jak2 lo cual potencializa las vías de señalización tirosina cinasa asociadas a proliferación, mientras que erbB4 favorece la regulación de proteasas y citocinas implicadas en la angiogénesis y proliferación e invasión celular.^{16, 20, 22}

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

Las características clínicas e histológicas sugieren al DMBA y OH como inductores y promotores, respectivamente en el modelo de carcinogénesis presentado.

La conjunción de ambos compuestos genera lesiones de mayor volumen y mayor grado de malignidad.

La expresión de erbB2, erbB3 y erbB4 incrementó en los tres grupos experimentales.

En condiciones histológicas similares se presentaron diferencias en la expresión de erbB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes L, Eveson J. Pathology and Genetics Head and Neck Tumours World Health Organization Classification of Tumours. Editorial IARC: 168-74.
2. Parkin M, Bray F. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55 (2): 74-108.
3. C.C.-RHM-01 MORTALIDAD y MORBILIDAD. Compendio de Cáncer 2001. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaria de Salud.
4. Leyva E, Gaitán L. Patología General e Inmunología. 1ª ed. Editorial Trillas, 2008 pp. 2760-70.
5. Mitchell RN, Kumar V, Robbins C. Compendio de Patología Estructural y Funcional 7ª ed. Editorial Elsevier, 2008 pp. 46-49.
6. White S, Pharoah M. Radiología oral 4ª edición Elsevier España 2002: pp. 418-419.
7. Phillip J, Eversole L, Wysocki G. Patología Oral y Maxilofacial 2ª ed. Editorial Elsevier, 2005 pp. 184-96.
8. Luch A. Nature and Nurture Lessons from Chemical Carcinogenesis. Nature Reviews Cancer 2005; 5 (2): 113-25.
9. Rubín, E. Farber J. Patología Editorial Médica Panamericana, 1992. pp87-94
10. Pardo J. Anatomía Patológica General Vol. 1 Elsevier 1ª ed. 1996. pp. 331-340.
11. García V. González MA. Bases moleculares del cáncer oral avances en odontoestomatología. 2005; 21 (6): 287-295.
12. Chimenos E, Font I, López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares Medicina y Patología Oral / Oral Medicine and Pathology. 2004; 9 377-84.
13. Monilola A, Richard M, Heidi A, Hynes N. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. The EMBO Journal. 2000;19 (13): 3159-3167.
14. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy Oncogene 2000. 19 (56): 6550-6565.
15. Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. Rev Biochem 1983; 14, (2): 93-111.

16. Pornchai P, O-charoenrat. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2002; 38 (1): 73-80.
17. Rautava. J ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncology*. 2008; 44 (3): 227-235.
18. Silva S, Perez D. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. *Oral Oncology* 2008; 44 (5): 484-490.
19. Wong R, Todd T. *Molecular Biology of Human Oral Cancer Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1996; 7 (4): 319-28.
20. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology* 2007; 43, 523– 534.
21. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA. The ErbB receptor tyrosine family as signalIntegrators. *Endocrine-Related Cancer*. 2001; 8: 151–159.
22. Yang. Y, Zeng T. Effect of genistein on DMBA induced oral carcinogenesis in hamster. *Carcinogenesis* 2006; 27 (3): 578–583.
23. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer. *Epidemiology and molecular biology*. *Head Neck* 1998; 20 (3) 250-265.
24. Pardo FJ. *Compendio de anatomía patológica*. Elsevier España, 1998 pp. 256-58.
25. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57–70.
26. Vairaktaris E, Spyridonidou S. The hamster model of sequential oral oncogénesis. *Oral Oncology*. 2008. 44 (4): 315-324.
27. Altuwaigi OS, Papageorge MB, Doku HC. The cancer promoting effect of N-nitrosornicotine used in combination with a subcarcinogenic dose of 4-nitroquinoline-N-oxide and 7,12-dimethylbenzanthracene. *J Oral Maxillofacial Surg*. 1995; 53 (8):910-3.
28. Van D, Ould K, Mhamed O. Sidi A. Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization and phylogenetic analysis. *J Virol*. 2009. 10: 1777-08.
29. Helmut S. Sticke F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2007; 7: 599-612.

30. Raspall G. Tumores de cabeza y cuello. Elsevier. 2ª Ed 1999 pp. 47-68
31. Norman K. Diagnóstico diferencial de las lesiones orales y maxilofaciales. 5ª Ed Elsevier 1998. pp 565.
32. Lisboa A, Pereira J, Ferreira A. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. Pesquisa Odontológica Brasileira. 2002; 16: (3) 216-219.
33. Lam E, Kelley E, Martin S. Detection and cloning of potent transforming gene(s) from chewing tobacco-related human oral carcinomas. European Journal Cancer B Oral Oncology. 1994; 30 (4): 268-277.
34. Marx R, Stern D. Oral and Maxillofacial Pathology. Quintessence. 2003 pp 285-289.
35. Zheng SS. Chemoprevention of 7,12dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 tyrosine kinases. Oral Oncology. 2008; 44 (7): 652-7.
36. Richard P. Elzay Local Effect of Alcohol in Combination with DMBA on Hamster Cheek Pouch J DENT RES 1966; 45: 1788-1795.
37. Warnakulasuriya. S. Oral epithelial dysplasia classification systems predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement J Oral Pathol Med. 2008; 37 (3): 127-33.
38. Wieduwilt MJ, Moasser M. The epidermal growth factor receptor family. Biology driving targeted therapeutics. Cell Mol Life Sci. 2008; 65 (10): 1566-1584.
39. Urtasun R, Nieto N. Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo. Revista española de enfermedades digestivas. 2007; 99 (4): 223-230.
40. Kumar SD, Alcohol-induced oxidative stress. Life Sciences Elsevier. 2007; 81: 177–187.
41. Shao Ch. Edward R. Markers of Cell Proliferation in Normal Epithelia and Dysplastic Leukoplakias of the Oral Cavity. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 1998; 7: 597-603.
42. Danijel Z. The Ljubljana classification its application to grading oral epithelial Hyperplasia. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2003; 31: 75–79.
43. Zima T, Kalousova. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res. 2005; 29 (11 Suppl): 111s-114s.

44. de Vicente JC. Expresión de las proteínas de los proto-oncogenes ErbB-3 y ErbB-4 en el carcinoma oral de células escamosas: estudio piloto. *Med Oral* 2003; 8: 374-81.
45. Aurore T. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour Spreading. *EMBO Molecular Medicine*. 2010; 2 (6): 211-230.
46. Eleftherios V. Enhancement of erbB2 and erbB3 expression during oral Oncogenesis in diabetic rats. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2008; 134 (3): 337-344.
47. Aguirre P, Aguirre J. Displasia epitelial. Concepto y significación. *Odontoestomatol* 2008; 24 (1): 81-88.
48. Gómez J, Vicente V. Estudio comparativo de la aplicación del hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA) sobre la mucosa oral del hámster y del cobaya. *REV ESP PATOL* 2009; 42 (4): 287-295.