



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**Determinación de la expresión, fosforilación y transducción de receptores erbB y su relación con proliferación durante el proceso de transformación del carcinoma oral de células escamosas.**

**Presenta**

**Mtro. Luis Fernando Jacinto Alemán**

**Área de Especialización Biología Bucal**

**Para obtener el grado de Doctorado**

**Tutor: Dr. Juan Carlos Cuauhtémoc Hernández Guerrero**

**Asesor: Dra. María Dolores Jiménez Farfán**

**Comité Tutorial:**

**Elba Rosa Leyva Huerta**

**Alejandro García Carranca**

**Edgar Zenteno Galindo**

Este estudio es apoyado por los PAPIIT IN228407-2 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.

## Índice

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
Epidemiología	6
Características generales	7
Características clínicas, radiológicas e histológicas	7
Factores de riesgo	9
Carcinogénesis química oral (alcohol y tabaco)	10
Receptores erbB. Activación y transducción en cáncer	13
Planteamiento del problema	18
Justificación del problema	20
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis	22
Variables independientes	22
Variables dependientes	22
Materiales y Métodos	23
Población	23
Análisis Histológico e Inmunohistoquímico	24
Western blot	26
Inmunoprecipitación	28
Análisis de actividad proliferativa	28
Compendio y análisis estadístico	29
Resultados	30

Población, frecuencia y volumen tumoral	30
Análisis Histológico	30
Expresión de erbB	30
Inmunoprecipitación receptores erbB-PY20	31
Inmunoexpresión de c-Jun, c-Fos, Ki-67 y NF-kb	32
Expresión de ERK, AKT y PTEN	33
Discusión y Conclusiones	34
Referencias	46
Apéndice A. Tablas	56
Apéndice B. Figuras	59

## RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un problema mundial de salud, asociado principalmente al consumo de cada vez más constante del tabaco y alcohol. Se ha reportado que los receptores erbB están implicados en su desarrollo neoplásico. Su activación es parte inicial de eventos transduccionales que modulan la conducta celular. Moléculas tales como ERK1/2, AKT, PTEN, AP-1, y NF- $\kappa$ B pueden ser activadas directa o indirectamente generando cambios en la diferenciación y proliferación celular. Si lográsemos entender la conducta molecular respecto a la condición histológica durante el proceso de transformación maligna del COCE nuestro conocimiento en la oncología oral mejoraría. **Objetivo:** Determinar la asociación entre la expresión y fosforilación de los receptores erbB y moléculas asociadas a proliferación según la condición histológica en el sistema de carcinogénesis química oral en hámster sirio. **Métodos:** Cincuenta hámsteres sirio dorado fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos; dos grupos control (A y B) y tres experimentales, un grupo expuesto a etanol (C), DMBA (D) y a ambas sustancias (E) durante 14 semanas. Se determinó el volumen y frecuencia tumoral, análisis histológico, inmunohistoquímico, Western blot e inmunoprecipitación para erbB, así como la expresión de c-Jun, c-Fos, NF- $\kappa$ B, ERK1/2, AKT, PTEN y fracción de células en proliferación por Ki-67. **Resultados:** Los grupos A, B y C presentaron mucosas clínica e histológicamente normales, mientras los grupos D y E presentaron tumores con diagnóstico histológico de displasia y carcinoma de células escamosas. La expresión de las moléculas analizadas según su condición histológica mostró diferencias en condiciones similares principalmente para erbB2, 3 y 4. La expresión de p-ERK, p-AKT y Ki-67 fue mayor en los grupos expuesto a alcohol, así mismo se observó una relación inversa entre la disminución de PTEN y

aumento de NF- $\kappa$ B en el grupo C y D. **Conclusiones:** el DMBA y el alcohol podrían ser considerados como inductor y promotor tumoral, respectivamente. En condiciones histológicas similares, como displasias y carcinomas desarrollados en bajo distintos esquemas carcinogénicos se observó cambios en la expresión de estas moléculas, lo cual podría ser debido a la heterogeneidad celular o bien por la exposición diferencial al tipo de factor de riesgo.

## INTRODUCCIÓN

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es una neoplasia epitelial maligna invasiva, que presenta tres grados de diferenciación histológica, invasión temprana, además de metástasis a linfonodos locales y regionales. Se presenta predominantemente en personas entre la quinta y sexta década de la vida que consumen alcohol y tabaco.

Datos globales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicaron que principalmente en países en desarrollo se ha incrementado el número de personas con diagnóstico de cáncer. El aumento en la esperanza de vida, así como, la mayor exposición a factores de riesgo (tabaco, alcohol, dietas inapropiadas y sedentarismo) pueden ser los responsables.

Clínicamente los carcinomas orales pueden presentarse como lesiones ulceradas hasta crecimientos tumorales con áreas de necrosis, variando según la zona anatómica afectada. A través del análisis histopatológico podemos establecer su diagnóstico definitivo, así como su gradificación histológica. Los estudios en genómica y proteómica han postulado diferentes moléculas como biomarcadores candidatos para la determinación de fenotipos, elección tratamiento y análisis de la conducta biológica intentando establecer una relación directa o indirecta más precisa.

Dentro de las moléculas postuladas se ha mencionado a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, que incluye a EGFR/erbB1, erbB2/Neu/HER2, erbB3/HER3 y erbB4/HER4. Estos han sido ampliamente estudiados en diferentes neoplasias, incluyendo al COCE. Estos receptores participan de forma normal en la embriogénesis, proliferación y diferenciación celular. La sobreexpresión de estos receptores se ha asociado con estados avanzados de la enfermedad, así como con metástasis a ganglios linfáticos o linfonodos. La

formación de homo y/o heterodímeros de estos receptores induce su autofosforilación en aminoácidos tirosina específicos, lo cual promueve cascadas de transducción de las Proteínas Cinasas Asociadas a Mitogenos (MAPK por sus siglas en inglés) ERK, JNK y/o p38, moléculas responsables de la conducta celular, principalmente proliferación y supervivencia. La sobreactivación o sobreexpresión de ERK, así como la vía PI3K-AKT han sido implicadas en el carcinoma oral. En esta última vía se considera que AKT es la principal cinasa efectora y dentro de sus funciones más importantes destaca su participación el crecimiento de piel, hueso y musculo; participa en la angiogénesis, regulación metabólica de la glucosa y supervivencia celular. La actividad de AKT depende de la fosfatasa PTEN, este último es considerado un gen supresor tumoral implicado en la inhibición de la migración celular e invasión. Deleciones o mutaciones somáticas en el gen PTEN se han implicado en el desarrollo de neoplasias como gliomas, cáncer de mama, pulmón, endometrio y melanomas.

Se ha considerado que el tener mayor tasa o frecuencia de proliferación se genera la posibilidad de un mayor número de células, las cuales pueden adquirir nuevas mutaciones, promoviendo poblaciones celulares cada vez más heterogéneas. El complejo AP-1 (conformado por las proteínas c-Fos y/o c-Jun) y NF- $\kappa$ B, son factores de transcripción que se puede unir a regiones promotoras de genes asociados a la proliferación, generando la posibilidad antes mencionada. El observar en número o tasa de células proliferantes, es decir el número de células activas o comprometidas en el ciclo celular o mitosis, puede ser cuantificado a través de células que expresen el antígeno MIB1 (Ki-67). Esta circunstancia nos podría dar una idea más completa de lo que ocurre en nuestra neoplasia, así como poder asociarlo con variables clínicas e histológicas del tumor. Para esto se requiere el empleo de modelos animales, los cuales son una



buena alternativa en el análisis de la carcinogénesis y entendimiento de la conducta biológica del cáncer. Uno de los modelos utilizados en la carcinogénesis química oral es el carillo (bolsa de alimento) del hámster sirio dorado. Su similitud histológica al epitelio oral humano, el no desarrollar de manera espontánea tumores y la susceptibilidad sistémica a hormonas, micronutrientes u otras sustancias como los hidrocarburos aromáticos del tabaco (DMBA) o el alcohol, convierte a este modelo animal en el modelo estándar de oro para el estudio de cáncer oral. En este estudio se tratara de determinar la asociación entre la expresión y fosforilación de los receptores erbB y moléculas asociadas a proliferación según la condición histológica en el sistema de carcinogénesis química oral en hámster sirio.

## **ANTECEDENTES**

### **Epidemiología**

El cáncer es un problema a nivel mundial, datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicaron que más de 20 millones de personas viven con diagnóstico de cáncer, principalmente en países en desarrollo. Se proyecta que para el año 2020 a nivel mundial se desarrollarán 15 millones de nuevos casos y habrá 10 millones de decesos debido a esta patología. Este gran número de casos es en parte debido al incremento en la edad y esperanza de vida en la población mundial, así como al incremento en la exposición a factores de riesgo (Stewart, 2003). En el 2008, la OMS a través de Globocan, reportó 12, 662, 600 de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, así como 7, 564, 800 muertes asociadas. En este mismo año se reportaron 263, 020 nuevos casos de cáncer oral, con una mortalidad de 127, 654 personas (Globocan, 2008).

Durante ese mismo periodo datos de Globocan en México indicaron 127, 000 nuevos casos de cáncer y 77, 700 muertes relacionadas. Así mismo, se reportaron 2, 300 casos de cáncer oral y 608 muertes asociadas, representado el 1.8% y 0.78% del total, respectivamente. Cifras de la Secretaria de Salud del año 2001, indicaron que el cáncer oral presentaba 774 casos y correspondía al 0.75% del total de los tumores, estos datos sugieren que ha existido aumento en la incidencia de esta neoplasia (Betancourt, 2001).

## **Características generales**

### ***Características clínicas, radiológicas e histológicas***

La mayoría de los cánceres orales son diagnosticados como carcinoma oral de células escamosas (COCE). El COCE es una neoplasia epitelial maligna invasiva, con diversos grados de diferenciación histológica y propensión a la pronta metástasis a ganglios linfáticos regionales.

La incidencia del COCE es mayor en adultos consumidores de alcohol y tabaco que se encuentran entre la quinta y sexta década de vida (Barnes, et al., 2005).

De manera habitual los pacientes con COCE no presentan síntomas en etapas tempranas, no obstante, en algunos pacientes se pueden presentar síntomas vagos y hallazgos clínicos mínimos, así como lesiones premalignas (leucoplasias o eritroplasias) y ulceraciones (Ludwing & Weinstein, 2005; Scully & Bagan, 2009). La sintomatología puede variar de acuerdo con la zona anatómica afectada; en lengua se puede referir dolor y/o crecimientos infiltrativos o exofíticos, mientras que en labio inferior se suele reportar zonas elevadas eritroplásicas, leucoplásicas o mixtas con ulceraciones no cicatrizantes (Leite & Koifman, 1998).

Los hallazgos radiográficos ocurren únicamente cuando el carcinoma involucra a hueso (maxilar o mandíbula), caracterizándose por bordes mal definidos, sin cortical o bien como erosiones subyacentes. La principal utilidad del análisis radiográfico se fundamenta en el análisis prequirúrgico (Barnes, et al., 2005).

Las características histológicas comúnmente presentadas por el carcinoma oral de células escamosas son la pérdida de la membrana basal, pérdida de la arquitectura del estrato basal, mayor número de mitosis, cambios displásicos, con presencia de pleomorfismo celular e

invasión del tejido conjuntivo subyacente en forma aislada o como agregados o islas celulares (Konkimalla, et al., 2007).

La OMS postuló una gradificación histológica con base en la diferenciación, pleomorfismo celular, queratinización o cornificación y número de mitosis, dividiendo al COCE en tres grados (Pindborg, et al., 1997):

- 1) Bien diferenciado: Presenta múltiples perlas córneas o queratinización en un 75% de la población celular, presencia de puentes intercelulares o uniones desmosómicas; menos de 2 mitosis por campo óptico (40X), con rara presencia de mitosis atípicas o aberrantes y pleomorfismo celular y nuclear reducido.
- 2) Moderadamente diferenciado: Menor presencia de perlas córneas y queratinización en un 25 a 75% de la población celular, no se observan puentes intercelulares o uniones desmosómicas, de 2 a 4 mitosis por campo óptico, con mayor presencia de mitosis atípicas o aberrantes y moderado pleomorfismo celular y nuclear.
- 3) Pobrementemente diferenciado: Ausencia de perlas córneas y queratinización individual, no se observan puentes intercelulares, más de 5 mitosis por campo óptico, frecuentes mitosis atípicas o aberrantes y pronunciado pleomorfismo celular y nuclear.

El diagnóstico y gradificación histopatológica son considerados como el método diagnóstico por excelencia, sin embargo, aún existe controversia respecto a su utilidad como herramienta de valor predictivo en la conducta biológica del COCE, por lo cual se ha tratado de determinar la asociación directa o indirecta de otras variables clínicas, histológicas, celulares o moleculares en su estudio.

## **Factores de riesgo**

Los factores de riesgo asociados al desarrollo del COCE pueden ser ambientales, genéticos y epigenéticos. En la actualidad 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 o ambientales que conducen a la formación y acción de oncogenes y la pérdida de dos o más genes supresores tumorales (Pelucchi, et al., 2006).

Dentro de los factores de riesgo exógenos más frecuente asociados podemos encontrar a factores físicos (luz UV), biológicos (VPH y VEB) y químicos (alcohol y tabaco), siendo estos últimos los principalmente reportados dentro de los antecedentes de pacientes con COCE (Gillison, et al., 2000). Otros factores de riesgo implicados en el desarrollo neoplásico son la condición socioeconómica y el estado nutricional. El riesgo familiar para el desarrollo de COCE ha sido reportado en un porcentaje pequeño de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, sin embargo, se ha reportado que polimorfismos en genes asociados al metabolismo de xenobioticos (CYP1A1, genes que codifican para glutatión S-transferasa y N-acetiltransferasa) pueden estar asociados a personas con mayor susceptibilidad. Individuos que presentan el alelo de metabolismo rápido para el gen de la enzima alcohol deshidrogenasa tipo 3 podrían ser particularmente más vulnerables a los efectos del consumo crónico del alcohol (Sato, et al., 2000; Harty, et al., 1997).

### **Carcinogénesis química oral (Tabaco y alcohol).**

La carcinogénesis es el mecanismo o proceso a través del cual se desarrolla una neoplasia. La carcinogénesis puede ser clasificada según el número de factores carcinogénicos (unifactorial o multifactorial), así como por la naturaleza del agente (física, biológica o química). El COCE se relaciona principalmente a la carcinogénesis química debido a la exposición y consumo de alcohol y tabaco (Lam, et al., 1994).

La carcinogénesis química se caracteriza por la exposición sustancias químicas capaces de inducir neoplasias de forma directa o 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 (ácidos nucleicos y/o proteínas) y así promover cambios neoplásicos. Dentro de los carcinógenos indirectos más reconocidos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), tales como el benzopireno, metilcolantreno, dibenzantraceno y 7-12 dimetilbenza(a)anthraceno o DMBA, estos compuestos son metabolizados por oxidasas de función mixta dependiente del citocromo p450, proporcionándoles el potencial de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, formando productos de adición o aductos para generar mutaciones que favorezcan la formación neoplásica (Lee, et al., 2002).

Se ha postulado una secuencia particular en el desarrollo carcinogénico de una célula expuesta a un agente carcinogénico, observando cierto grado de reproductibilidad dentro del proceso: iniciación, promoción, transformación y progresión (Luch, 2005). La iniciación comienza cuando el ADN de la célula o de una población de células se daña por la exposición a factores

carcinogénicos; la sensibilidad de las células mutadas respecto a su microambiente puede alterarse, lo cual podría favorecer un crecimiento más rápido comparado a las células no alteradas. La promoción tumoral se caracteriza por una proliferación clonal de las células iniciantes o mutadas, como resultado de la expresión alterada de genes responsables de la proliferación. La transformación es el cambio de una célula precancérgica a una cancerígena, debido a la adquisición de un fenotipo y genotipo maligno por el desarrollo de nuevas mutaciones. La progresión se inicia cuando células cancerígenas han acumulado mutaciones que favorecen el desarrollo de una población neoplásica heterogénea, con alteraciones en los oncogenes, genes supresores de tumores, genes reparadores de ADN, etc.

Dentro de los componentes del tabaco se encuentra el DMBA, que es un químico altamente corrosivo, inflamable 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 (Dipple, 1983). El DMBA es considerado un carcinogénico indirecto y en exposiciones prolongadas puede provocar mutaciones en el ADN induciendo lesiones crónicas en pulmones y cavidad oral que concluyen en neoplasias.

Otro factor de riesgo para el desarrollo neoplásico oral es el alcohol, el cual es considerado un potente carcinogénico y promotor de tumores. El potencial carcinogénico del alcohol se basa en su metabolismo a acetaldehído. El alcohol y acetaldehído pueden concentrarse en saliva y placa dentobacteriana, alterando el metabolismo celular debido a su oxidación, así mismo, el acetaldehído puede interferir en la reparación y síntesis del ADN. Estudios *in vitro*, indican que el acetaldehído puede causar anormalidades citogenéticas y mutaciones en hipoxantina

fosforibotransferasa produciendo aductos con ADN, lo cual puede inducir a la carcinogénesis (Baan, et al., 2007; Bianchini, et al., 2002; Corrao, et al., 2002; Seitz & Stickel, 2007).

El empleo de modelos animales y estudios *in vitro*, que representen los cambios celulares y moleculares asociados con la iniciación y progresión del COCE son de crucial importancia. El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es el modelo más conocido y utilizado en la carcinogénesis oral considerándose como el estándar de oro en las investigaciones relacionadas. Lo anterior es debido al desarrollo de lesiones premalignas y malignas similares a las desarrolladas en el ser humano a través de la exposición a sustancias como benzopireno, nitrosaminas o DMBA (Altuwairgi, et al., 1995). Este modelo es universalmente utilizado para estudios de cáncer bucal, ya que aprovecha la particularidad anatómica del hámster, un bolsillo o bolsa de alimento situada en el espesor de la mejilla, el cual se encuentra cubierto por una mucosa. En esta estructura que los hámsteres utilizan fisiológicamente para el transporte de alimentos secos, se pueden inducir neoplasias mediante la aplicación tópica de cancerígenos químicos sobre la superficie mucosa, proporcionando un control y reproducibilidad en el modelo (Andrejevic, et al., 1996; Vairaktaris, et al., 2008; Yang & Zhou, 2006). Este tipo de modelos permite obtener variables clínicas e histológicas del COCE, además poder realizar estudios celulares y moleculares. Cambios en lipoperoxidación, control epigenético, proliferación celular, angiogénesis y apoptosis son algunos de los fenómenos reportados en los tumores desarrollados en este modelo animal (Suresh, et al., 2010; Chung, et al., 2009; Letchoumy, et al., 2007).



## **Receptores *erbB*. Activación y transducción en cáncer**

Dentro de los eventos moleculares asociados frecuentemente al desarrollo neoplásico se ha demostrado que la autosuficiencia de señales proliferativas puede ser derivada de la activación de oncogenes (Hanahan & Weinberg, 2000). Los oncogenes son genes derivados de la mutación de proto-oncogenes, los cuales colaboran en la transformación celular maligna, principalmente a través de la promoción de la proliferación celular, evasión de la apoptosis o estableciendo mecanismos de supervivencia celular en condiciones adversas (de Laat, et al., 1999). Dentro de los distintos tipos de oncogenes se encuentran factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, proteínas transductoras citoplasmáticas, factores de transcripción, proteínas responsables de la activación del ciclo celular y evasión de la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000).

La familia *erbB* codifica para receptores de factores de crecimiento epitelial. Tiene cuatro miembros llamados *erbB1/EGFR/HER1*, *erbB2/Neu/HER2*, *erbB3/HER3* y *erbB4/HER4*. Estos receptores tirosina cinasa se encuentran expresados en diferentes tejidos de origen ectodérmico y mesenquimal. Sus loci en el genoma humano ha sido mapeado en los cromosomas 7p12, 17q21.1, 12q13 y 2q33-34, respectivamente. Bajo condiciones fisiológicas estos receptores glucoproteicos tirosina cinasa se activan por homo y/o heterodimerización, promovida por la unión a sus ligandos o por una elevada densidad del receptor en membrana, debido a su sobreexpresión. Su 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.

El primer receptor erbB en ser implicado en el desarrollo neoplásico fue erbB1. Las alteraciones reportadas para este receptor han sido amplificaciones del gen, sobreexpresión, así como rearrreglos estructurales y mutaciones en los dominios extracelulares y tirosina cinasa (Ekstrand, et al., 1992; Gschwind, et al., 2004). Se ha reportado que carcinomas orales de células escamosas que sobre expresan erbB1, presentan mayor proliferación tumoral e inducción de la expresión de moléculas relacionadas con angiogénesis (Alroy & Yarden, 1997). El receptor erbB2 normalmente se implica en el desarrollo embrionario y de tejido nervioso, sin embargo, la participación de este receptor en la transformación maligna de células adultas a través de amplificaciones y sobreexpresiones, ha sido asociada con diferentes neoplasias (mama, ovario, neoplasias gástricas, glándulas salivales y COCE). Se considera que su principal función es la potencialización de vías de señalización generadas por otros receptores erbB (Fong, et al., 2008; Mendelsohn & Baselga, 2000). Se ha reportado que erbB3 es activado por heterodimerización y su función normal es la de regular el ciclo y diferenciación celular. Se considera que el heterodímero de erbB2-erbB3 puede inducir la transducción de la vía PI3K-AKT promoviendo la proliferación tumoral, así como inhibir la apoptosis. El receptor erbB4 generalmente es asociado a carcinomas, ya que de forma normal en la presencia de erbB1, este receptor no se expresa, sin embargo en neoplasias su expresión se ve involucrada en la transcripción y regulación de proteasas y citocinas implicadas en la angiogénesis e invasión celular (Junttila, et al., 2005).

Las cascadas de transducción activadas por estos receptores pueden favorecer la proliferación, diferenciación y/o movilidad celular, entre otras funciones celulares. La activación de las Proteínas Cinasas Asociadas a Mitogenos (MAPK, por sus siglas en inglés) como ERK, JNK y/o

p38, puede ser responsable de la conducta celular, ya sea proliferación o supervivencia (Torii, et al., 2006). La proteína ERK presenta dos isoformas principales (ERK1, p44 y ERK2, p42), las cuales son rápidamente activadas por estímulos extracelulares tales como la activación de receptores a factores de crecimiento como los erbB. La traslocación a núcleo de fosfo-ERK1/2, es un evento de crucial importancia durante el paso de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>, ya que permite la fosforilación de Elk-1 y c-Fos, activando la transcripción de genes implicados en la proliferación (Mebratu & Tesfaigzi, 2009). Se ha reportado que la sobreactivación o sobreexpresión de ERK o c-Fos juegan un papel crucial en el desarrollo neoplásico (Mebratu & Tesfaigzi, 2009). c-Fos pertenece a la familia de proteínas del complejo AP-1, la cual esta formada por las proteínas Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, fosB) y las proteínas Jun (c-Jun y junB). La función del complejo AP-1 es regular la transcripción de ciertos genes, dependiendo de la composición del heterodímero Fos-Jun, siendo la inducción de la proliferación el evento celular de mayor frecuencia. Estas moléculas también se han implicado en la transformación neoplásica de carcinomas de mama, endometrio, cérvix y ovario, no obstante, su asociación en la carcinogénesis oral aun no es clara (de Sousa, et al., 2002).

En el COCE, la presencia y función de ERK y AP-1 es controversial, no obstante, su efecto terminal de ambas moléculas es la proliferación, por lo cual el empleo de marcadores de proliferación son requeridos. Estos marcadores pueden ser clasificados como: marcadores de la fracción de crecimiento, marcadores de la fase del ciclo y marcadores del tiempo del ciclo celular. El anticuerpo Ki-67 (MIB1), el cual ha sido utilizado como marcador para determinar la fracción de crecimiento, es decir la proporción de células que se encuentran activas o dentro del ciclo celular durante G<sub>1</sub>, S o G<sub>2</sub>, ha mostrado gran utilidad en relación con la predicción de

recurrencia, resistencia a quimio y/o radioterapia del COCE (Pich, et al., 2004; Wangsa, et al., 2008). No obstante, nunca ha sido determinada su relación según la condición histológica y factor de riesgo expuesto durante el proceso de transformación maligna. El determinar el potencial proliferativo de una neoplasia, es importante ya que cuando una célula neoplásica prolifera genera una nueva generación de células con el potencial de adquirir nuevas características y/o mutaciones, generando poblaciones celulares heterogéneas, lo cual podría modificar la conducta biológica de la neoplasia, así como el pronóstico del paciente (Schlessinger, et al., 1983).

Otra vía de transducción importante en la proliferación, angiogénesis, invasión y supervivencia celular es la vía PI3K-AKT. La proteína AKT es la cinasa efectora principal de esta vía, dentro de sus funciones más importantes se puede destacar el crecimiento de piel, hueso y musculo, participa en la angiogénesis, regulación metabólica de la glucosa, embriogénesis y supervivencia celular entre otras. La amplificación de AKT ha sido demostrada en ciertas neoplasias como carcinomas gástricos, cáncer de ovario, páncreas y melanoma. La actividad de AKT depende de la fosfatasa PTEN, este gen supresor tumoral está implicado en la inhibición de los fosfoinositidos generados por PI3K, puesto que al inhibir dichos productos se suprime la activación de AKT, su función como gen supresor tumoral se ha asociado a la inhibición de la migración celular e invasión generada por AKT (Gonzalez & McGraw, 2009; Hanada, et al., 2004; Kurasawa, et al., 2008; Wang, et al., 2005). Deleciones o mutaciones somáticas del gen de PTEN se ha implicado en el desarrollo de neoplasias como gliomas, cáncer de mama, pulmón, endometrio y melanomas. La investigación de la relación de AKT y PTEN en el desarrollo neoplásico se ha enfocado en el entendimiento la actividad directa o indirecta de otras

moléculas reguladoras de la conducta celular, mostrando que AKT es capaz de inducir la evasión de la apoptosis debido a la inactivación de factores proapoptóticos como BAD, procaspasa-9 y proteínas FOXO, así como por la activación de NF- $\kappa$ B, la cual también se ha implicado en el desarrollo neoplásico (Gonzalez & McGraw, 2009). La molécula NF- $\kappa$ B fue originalmente llamada así por su capacidad de actuar como incrementador (enhancer) de la transcripción y traducción de la cadena kappa ligera de las inmunoglobulinas. Esta molécula participa en procesos del desarrollo y crecimiento humano, cicatrización, inflamación, así como en la patogénesis de neoplasias. La activación de NF- $\kappa$ B se ha ligado a la proliferación, supervivencia, invasión y angiogénesis en la neoplasia, no obstante su relación con el cáncer oral no ha sido determinada claramente (Brown, et al., 2008).

El tratar de entender la participación de estas moléculas responsables de la proliferación celular y otras funciones celulares durante el proceso de transformación maligna, nos otorgara mayor conocimiento sobre la conducta biológica del COCE para así poder postular mejores pronósticos y favorecer el desarrollo de nuevas y mejores estrategias terapéuticas.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El carcinoma oral de células escamosas es actualmente un problema de salud pública no solo por su incidencia y mortalidad, sino por la amplia distribución y uso de los factores de riesgo implicados (alcohol y tabaco). Estudios demuestran que el tabaco y principalmente los hidrocarburos aromáticos policíclicos puede provocar el desarrollo de lesiones displásicas; así mismo, el consumo de alcohol causa cambios en las células al ser metabolizado en acetaldehído, provocando eventos carcinogénicos. Ambos factores pueden actuar en forma sinérgica incrementando el riesgo a desarrollar COCE. Datos revelan que la exposición a estos dos compuestos ocurre más frecuente en los jóvenes, lo cual, a mediano o largo plazo puede incrementar el riesgo a desarrollar enfermedades crónicas y neoplasias, tal como el COCE. Los datos epidemiológicos son contundentes respecto a la asociación entre alcohol-tabaco y cáncer oral, no obstante, a pesar de esto aún no se determina por completo el mecanismo que produce la transformación maligna ante la exposición a dichas sustancias.

Diversos estudios han demostrado que el COCE puede presentar cambios en la expresión y actividad de moléculas tales como erbB, ERK, AP-1, AKT, PTEN y/o NF- $\kappa$ B. Amplificaciones, activación constitutiva, inhibiciones y sobreexpresiones, son algunos de los cambios reportados. El poder establecer el vínculo directo o indirecto entre la conducta molecular durante la transformación maligna derivada de la exposición a DMBA y Alcohol no solo nos permitiría entender que cambios ocurren en ese proceso, sino también podremos postular nuevas estrategias respecto a la terapéutica y pronóstico, al considerar anticipadamente el potencial de desarrollo de una lesión potencialmente maligna a neoplasia según la expresión de

ciertas moléculas. Hasta no poder establecer una relación más completa nuestro conocimiento de la neoplasia será incompleto.

## JUSTIFICACIÓN

El consumo de tabaco y el alcohol produce efectos nocivos a la salud, tal como el incremento en el desarrollo de neoplasias. A pesar de su largo tiempo de ser reconocidos como carcinógenos, aún no se ha determinado por completo los cambios particulares y/o procesos celulares y moleculares implicados en este proceso, tal es el caso de los receptores erbB. Estos receptores han sido localizados en carcinomas orales y en base a su función son considerados dentro de los principales efectores en la transformación maligna en el carcinoma oral, debido a que participan en eventos de proliferación, inhibición de apoptosis e invasión de células transformadas. Estas funciones son dependientes de la activación de proteínas transductoras como ERK y AKT y generar la transcripción por genes asociados a la proliferación por la acción de AP-1 y NF- $\kappa$ B. Su participación en la conducta celular es sumamente amplia, por lo cual actualmente son considerados como blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

El poder determinar qué relación directa o indirecta existe entre la expresión de los miembros de la familia erbB y moléculas de señalización o transducción, durante la carcinogénesis oral, comparando que patrones se expresan desde una mucosa sana hasta un carcinoma generado por alcohol, DMBA u ambos, nos podría otorgar mayor comprensión sobre el proceso de transformación maligna, beneficiando a futuro áreas tales como el pronóstico y tratamiento del COCE.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Determinar la asociación entre la expresión y fosforilación de los receptores erbB y moléculas asociadas a proliferación según la condición histológica en el sistema de carcinogénesis química oral en hámster sirio.

### **Objetivos específicos**

- Analizar el potencial carcinogénico del DMBA y/o alcohol en forma separada y conjunta en modelo de hámster sirio.
- Analizar la relación entre la expresión y fosforilación de erbB con la condición histológica y factor de riesgo asociado (DMBA y/o Alcohol).
- Analizar la expresión de ERK1/2, c-fos y c-jun, fracción de células proliferantes (Ki-67) y su relación con la condición histológica, factor de riesgo asociado (DMBA y/o Alcohol) y volumen tumoral.
- Analizar la expresión de AKT, PTEN y NF- $\kappa$ B y su relación con la condición histológica y factor de riesgo asociado (DMBA y/o Alcohol).

## **HIPÓTESIS**

La exposición a DMBA y alcohol inducirá el desarrollo de COCE con diferentes patrones de expresión de erbB, ERK1/2, AKT, PTEN, NF- $\kappa$ B, c-Fos y c-Jun; produciendo mayor fracción de células en proliferación celular.

### **Variables independientes**

Consumo de alcohol de los hámsteres (ml).

Condición y grado de diferenciación histológica (Mucosa normal, displásica o carcinoma).

Frecuencia tumoral (#  $\pm$ DE).

Volumen del tumor (mm<sup>3</sup>).

Expresión de erbB, ERK1/2, Akt, PTEN, NF- $\kappa$ B, c-Fos y c-Jun (Densitometría, media de pixeles para western Blot y Densidad óptica para inmunohistoquímica, uo/ $\mu$ m<sup>2</sup>).

### **Variables dependientes**

Tiempo de exposición a DMBA al 0.5% (14 semanas).

Tiempo de exposición a alcohol al 15% (14 semanas).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Población***

Se trabajó con una población de 50 hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*) de 5 semanas de edad con un peso aproximado de 80g, mantenidos en el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM. Este estudio animal conto con la aprobación del comité científico y ético del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM. A la octava semana los animales fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos: dos controles (A y B) y tres experimentales (C, D y E), colocando tres animales por caja. El grupo A permaneció sin tratamiento, mientras el grupo B recibió aplicaciones de aceite mineral (Sigma-aldrich, M8410, St. Louis, MO) en la bolsa de alimento derecha a través de un pincel fino natural (No. 4) mediante la técnica de goteo (Morris, 1961). Los grupos C y E consumieron alcohol etílico (Mallinckrodt Baker, V568, Xalostoc, Mexico) al 15% ad libitum como bebida de consumo normal, mientras que los grupos D y E recibieron aplicaciones de DMBA (Sigma-aldrich, D3254) al 0.5% diluido en aceite mineral en su bolsa de alimento derecha por la técnica goteo. Las aplicaciones de aceite mineral y DMBA fueron realizadas tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) durante catorce semanas siempre a las 10:00 horas para tratar de minimizar variaciones en la conducta de los animales. Cada tercer día se realizó medición del consumo de alcohol (grupos C y E) y peso semanal de todos los animales.

Cumplidas las catorce semanas todos los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de cloroformo (Sigma-Aldrich, C2432, St. Louis, MO), diseccionando las bolsas derechas de

alimento, lavándolas con solución salina de Hanks (Gibco-BRL, Cat. 24020-125 Paisley, Scotland UK). Para determinar la frecuencia de tumores se realizó la medición del número de tumores por bolsa de alimento, así como, la medición de dos diámetros perpendiculares de cada tumor para el posterior cálculo del volumen tumoral. Dicho volumen se obtuvo con la siguiente fórmula  $VT=a \times b^2 \times 0.52$ ; donde  $a$ = diámetro mayor,  $b$ = diámetro menor perpendicular al  $a$  (Yoshida, et al., 2005). Posteriormente, el 50% de la muestra fue fijada en paraformaldehído al 4% durante 24 h para su posterior procesamiento e inclusión en parafina, mientras el tejido restante fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

### ***Análisis Histológico e Inmunohistoquímico***

Las muestras fijadas fueron procesadas convencionalmente en parafina, realizando corte seriados de  $4\mu\text{m}$ . Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina para su posterior diagnóstico histológico llevado a cabo por un patólogo bucal, el cual clasificó las muestras como normal, displasia (leve, moderada y severa) y carcinoma (bien, moderado y pobremente diferenciados; BD, MD y PD, respectivamente) según los parámetros de la OMS (Pindborg, et al., 1997).

El análisis de la expresión inmunohistoquímica de erbB, NF- $\kappa$ B, c-fos y c-jun se realizó según lo reportado (Jimenez-Farfan, et al., 2005). Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en baños secuenciales de xilol y alcohol. Se realizó la restauración antigénica en solución de citratos al 0.01M a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3', se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, se bloqueó el marcaje inespecífico con albúmina al 2% y permeabilizó con Tritón-X100 al 0.2% durante 20' cada uno, para su posterior incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (erbB1, sc-03, rabbit polyclonal IgG, 1:100; erbB2, sc-7301, mouse monoclonal, IgG<sub>2a</sub>, 1:100; erbB3, sc-285, rabbit polyclonal, IgG; 1:100 and erbB4,

sc-283, rabbit polyclonal; NF- $\kappa$ B p65 (H-286) sc-7151, rabbit polyclonal, 1:100; c-Fos (4) sc-52 rabbit polyclonal, 1:100; c-Jun (H79) sc-1694, rabbit polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA), posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario y estreptavidina-HRP durante 30 minutos cada uno a temperatura ambiente, se reveló con DAB, contratiñendo con hematoxilina de Gills. El control negativo de cada muestra se obtuvo al sustituir el anticuerpo primario por PBS. El análisis inmunohistoquímico de la zona celular positiva fue (membrana, citoplasma y núcleo) a través de un método semicuantitativo, donde: - = 0% células, + = 1-29% de las células, ++ = 30-69% de las células y +++ = >70 % de las células presentaban positividad.

La medición del nivel de expresión a través de un software especializado (Imagelab, MCM Desing v2.2.4.0), el cual nos permitirá determinar la densidad óptica ( $uo/\mu m^2$ ) de cada célula positiva a través de un microscopio óptico Olympus XB40<sup>®</sup> (Olimpus XB40, Tokyo, Japan). De cada muestra se tomaron tres microfotografías de campos aleatorios en el objetivo 40x, con ayuda de la cámara digital Olympus C 3040<sup>®</sup> (Olimpus C-3040 Tokyo, Japan). Las imágenes obtenidas se analizaron por el sistema Imagen lab<sup>®</sup> (MCM Desing 2.2.4) ajustado a la escala micrométrica ( $\mu m$ ).

Tres parámetros fueron obtenidos: (1) porcentaje de células marcadas; (2) Intensidad Inmunotinción digital, y (3) índice digital de la expresión (Matos, et al., 2006).

El porcentaje de células marcadas (PCM) para cada caso fue realizado a través del observador que las clasificaba como células positivas o negativas para posteriormente determinar el resultado a través de la siguiente fórmula.

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

Total de células contadas

Para determinar la intensidad de inmunotición digital ( $I_{dig}$ ), el promedio de la densidad óptica ( $\Sigma DO$ ) de cada célula positiva fue calculado a través del promedio de los colores rojo, verde y azul (RGB, por sus siglas en ingles), de cada área del citoplasma de una célula positiva analizada, expresado en unidades ópticas por el micrómetro cuadrado ( $ou/\mu m^2$ ). El mismo procedimiento fue aplicado para obtener la densidad óptica del fondo ( $\Sigma DOF$ ) de cada muestra colocando el medidor en un área sin tejido o espacio vascular. El color blanco absoluto que corresponde al máximo de la densidad óptica fue utilizado como constante ( $320.7 ou/\mu m^2$ ). En base a estos parámetros se utilizó la siguiente fórmula:

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

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

$$IE_{dig} = \frac{PCM \times I_{dig}}{100} = ou/\mu m^2$$

100

Para posteriormente obtener la media del índice digital de la expresión de cada muestra.

### **Western Blot**

Se empleó para medir los niveles de expresión de erbB, ERK1/2, AKT y PTEN. Posterior al almacenaje y descongelamiento de las muestras, una porción de tejido de con una dimensión

aproximada de 5 x 5 x 5 mm fue homogenizada y lisada en un buffer de lisis compuesto por 225mM de sacarosa, 10mM Tris, 0.3 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de carbonato de sodio y un coctel de inhibidores de proteasas (1 mM Fluoruro de Fenimetilsulfonil, 10 mg/ml aprotinina, 5 mg/ml leupeptina, 5 mM benzamidina, 10 mg/ml Fenantrholine; BD, Bioscience Pharmigen, San Jose, CA). Los tejidos lisados fueron centrifugados a 10,000 rpm 4°C por 10'. La cuantificación de proteínas fue realizada por el método de Lowry (Lowry OH, et al., 1951). Un total de 25 µg de proteínas fue sometido a electroforesis SDS-PAGE al 10% por 120' a 150 mV. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas fueron bloqueadas con PBS-Triton 1% con 5% de leche libre de grasa (Svelty 0% grasa, Nestlé, Mexico) durante 2h para su posterior incubación durante toda la noche a 4°C en una solución del anticuerpo primario en bolsas plásticas selladas con calor (erbB1, sc-03, rabbit polyclonal IgG, 1:1500; erbB2, sc-7301, mouse monoclonal, IgG<sub>2a</sub>, 1:1500; erbB3, sc-285, rabbit polyclonal, IgG; 1:1500 and erbB4, sc-283, rabbit polyclonal, IgG, 1:1500; ERK1/2, sc-153, rabbit polyclonal, IgG, 1:1000, 1:1500; AKT1, sc-1619, goat polyclonal, IgG, 1:1500; PTEN, sc- 7974, mouse monoclonal, IgG<sub>1</sub>, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA). Posteriormente, dichas membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (goat anti-mouse IgG sc-2005, mouse anti-rabbit IgG-HRP, sc-2357, mouse anti-goat IgG-HRP, sc-2354, Santa Cruz Biotechnology, CA) durante una hora a temperatura ambiente. Los complejos inmunes fueron visualizados con el sistema ECL Western blot detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron expuestas a películas Kodak Biomax (Eastman Kodak, Co., Rochester, NY). Posteriormente las

membranas fueron desnudadas de complejos inmunes a través inmersión y agitación en la solución de 100mM b-mercaptoethanol, 62.5mM Tris-HCl and 2% SDS a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente las membranas para ERK1/2 y AKT fueron bloqueadas e incubadas con anticuerpos primarios (p-ERK, sc-7383, mouse monoclonal, IgG<sub>2a</sub>, 1:1000 y p-AKT, sc-7985R, rabbit polyclonal, IgG, 1:1000) como antes fue mencionado.  $\beta$ -actin (sigma A1978, mouse monoclonal, IgG<sub>1</sub>, 1:2000) fue usada como control de carga. Este análisis fue realizado en una muestra representativa de cada condición histológica de cada grupo de tratamiento por triplicado. Las películas fueron escaneadas y cuantificadas para su análisis densitométrico usando el software de medición densitométrica Scion Image® (NIH, Bethesda).

### ***Inmunoprecipitación***

Se adicionó 5 $\mu$ g de los anticuerpos anti-erbB a 500 $\mu$ g de proteína total. Se incubó toda la noche 4°C con agitación constante. Posteriormente se adicionó 50  $\mu$ l de proteína A-sefarosa, incubando a 4°C durante 3 horas. Se colecto la sefarosa mediante centrifugación para resuspenderla en buffer de lisis. Los precipitados fueron lavados tres veces con buffer de muestra, para posteriormente ser calentados 65°C durante 5 minutos en buffer de lisis. Seguidamente se colecto el sobrenadante realizado la electroforesis y Western blot para anti-pTyr (PY20, sc-508, mouse monoclonal IgG<sub>2b</sub>; 200  $\mu$ g/ml, 1:2000) como antes fue mencionado.

### ***Análisis de actividad proliferativa***

El desparafinado, rehidratación, restauración antigénica, inhibición de peroxidasa endógena, bloqueo de inespecificidad y permeabilización fue realizado como ya fue mencionado en la



técnica de inmunohistoquímica. Se incubo durante 2 horas con el anticuerpo primario MIB1 (Ki-67). La incubación con el anticuerpo secundario, estreptavidina-HRP, revelado con DAB se realizó acorde a lo mencionado. Se realizó cuantificación del número de núcleos positivos, de tres campos ópticos (40X) por cada muestra, obteniendo media y desviación estándar.

### ***Compendio y análisis estadístico***

Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión (Media y desviación estándar) para la frecuencia y volumen tumoral, índice de expresión digital y análisis densitométrico. Se realizaron las pruebas de ANOVA con U de Mann–Whitney para comparaciones de condiciones histológicas similares y análisis de correlación de Spearman para determinar la relación entre la fracción de células proliferantes y volumen tumoral. Se consideró como significativa una  $p \leq 0.05$ , utilizando el programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

## **RESULTADOS**

### ***Población, frecuencia y volumen tumoral***

La población final consistió en 47 hámster sirios (tres animales fallecieron debido a disputas territoriales, grupos D y E reportaron 2 y 1 pérdidas, respectivamente). El peso medio de  $99.2 \pm 6.6$  g con un rango de 89.6g a 106.9 g. El consumo semanal de alcohol de los animales de los grupos C y E fue de  $20.4 \pm 4.6$  ml y  $18.9 \pm 3.9$  ml, respectivamente.

Únicamente en los grupos D y E se observó la presencia de tumores; la frecuencia promedio del grupo D fue de  $3.28 \pm 1.79$  tumores con un volumen medio de  $15.4 \pm 9.8$  mm<sup>3</sup>; mientras que en el grupo E observamos una frecuencia media de  $2 \pm 0.75$  tumores con un volumen medio de  $84.69 (\pm 44.93)$  mm<sup>3</sup> (Cuadro 1).

### ***Análisis Histológico***

El análisis histológico indicó que los grupos controles A (sin tratamiento) y B (tratado con aceite mineral), así como el grupo C (expuesto a alcohol al 15%) presentaron mucosas histológicamente normales, mientras que los grupos D (expuesto a DMBA al 0.5%) y E (expuesto a DMBA y alcohol al 15%) desarrollaron displasias severas y carcinomas invasores (Cuadro 2, Fig. 1).

### ***Expresión de erbB***

La expresión de los receptores fue determinada a través de western blot e inmunohistoquímica según su condición histológica.

El análisis por Western Blot considerando la condición histológica indicó que la mucosa del grupo C expuesta a alcohol mostró aumento estadísticamente significativo en erbB2 y erbB3 comparado al control no tratado ( $p=0.04$  and  $p=0.01$ , respectivamente), mientras que erbB4

presentaba mínimo aumento en su expresión en las mucosas tratadas con alcohol, erbB1 no presento cambios contrastantes en su expresión. Al comparar las displasias severas de los grupos D y E observamos diferencias significativas en la expresión de erbB1 y erbB3 ( $p=0.042$  and  $p=0.038$ , respectivamente), así como erbB4; no obstante, la expresión de erbB2 fue similar para las displasias desarrolladas en ambos grupos experimentales. Los carcinomas BD de los grupos D y E únicamente presentaron diferencias significativas en la expresión de erbB1 ( $p=0.039$ ), conservando patrones similares en los tres receptores restantes. Los carcinomas MD y PD solo presentaron diferencias contrastante en la expresión de erbB3 (Fig. 2).

El análisis inmunohistoquímico de la expresión según la zona celular indicó diferencias en la expresión de los cuatro receptores. erbB1 presentó conducta similar en las mucosas histológicamente normales, no así en las DS y los COCE, donde la expresión citoplasmática aumentó comparado al control. erbB2, erbB3 y ernB4 mostraron patrones de expresión predominantemente citoplasmático en las mucosas histológicamente normales, sin embargo, en las displasias severas y carcinomas BD observamos aumento en la expresión a nivel de membrana (Fig. 3 y Cuadro 4).

#### ***Inmunoprecipitación receptores erbB-PY20***

Para determinar la expresión de los receptores erbB fosforilados se recurrió a la técnica de inmunoprecipitación. Nuestros resultados mostraron que las mucosas expuestas a alcohol presentaban mayor expresión de los cuatro receptores fosforilados comparado al grupo control. Las displasias severas de los grupos D y E presentaron mayor presencia de erbB2 y erbB3 fosforilados; sin embargo, al comparar los carcinomas BD de los grupos D y E observamos mayor fosforilación de los receptores erbB1, erbB2 y erbB3, en los carcinomas tratados

desarrollados en el grupo E (alcohol-DMBA), erbB4 no mostro cambios contrastantes en su fosforilación (Fig. 4).

#### ***Expresión de c-Jun, c-Fos, Ki-67 y NF-κB***

La expresión de estas moléculas fue determinada a través de la técnica de inmunohistoquímica. Al analizar la expresión de c-Jun y c-Fos observamos que en todas las condiciones histológicas homologas, independientemente del grupo de tratamiento se presentaba niveles de expresión similares, no obstante, la expresión de estas moléculas en las mucosas del grupo C, displasias severas y carcinomas era mayor a presentada por las mucosas control (Cuadro 5). La expresión según la zona celular mostro cambios para ambos marcadores. c-Fos y c-Jun presentaron mayor localización nuclear en las mucosas del grupo C tratadas con alcohol comparada a las mucosas control. Las DS y carcinomas BD presentaban no presentaron cambios importantes en el sitio de expresión de ambas moléculas (Cuadro 4), lo mismo que el carcinoma MD y PD.

El análisis de células proliferantes a través de la cantidad de células Ki-67 positivas, indico que en las mucosas histológicamente normales presentaban leve aumento en las tratadas con alcohol, no obstante, en las displasias severas y carcinomas BD del grupo E, se presentó aumento significativo ( $p=0.019$  y  $p=0.038$ , respectivamente) comparado a sus homólogos histológicos del grupo D (Cuadro 5).

La expresión de NF-κB presentó similar expresión en las mucosas histológicamente normales control, sin embargo, al comparar las mucosas tratadas con alcohol observamos aumento en su expresión ( $p= 0.031$ ). Las displasias severas de los grupos D y E no mostraron diferencias entre ellas, no así los carcinomas BD de los grupos D que presentaron aumento significativo en su expresión comparado con los carcinomas BD del grupo E ( $p=0.042$ ), los carcinoma MD y PD no

presentaron cambios contrastantes. El análisis del sitio de expresión indicó predominante presencia citoplasmática en la mayoría de las muestras, sin embargo, en las displasias severas y carcinomas bien diferenciados del grupo D, tratado únicamente con DMBA al 0.5% se observó mayor localización en núcleo (Fig. 5, Cuadro 4).

### ***Expresión de ERK1/2, AKT y PTEN***

Al analizar la expresión de p-ERK y ERK observamos cambios en condiciones histológicas similares. La mucosa expuesta a alcohol presentó aumentos estadísticamente significativo para ambas moléculas ( $p=0.027$  y  $P=0.026$ , respectivamente) al compararla con las mucosas control del grupo A. Las displasias severas y carcinomas BD de los grupos D y E presentaron expresiones similares, no obstante, su expresión fue mayor comparado al grupo control. Al analizar la expresión de p-AKT y AKT, observamos que AKT presentaba un patrón de expresión similar en todas las condiciones histológicas, no así p-AKT que presentó mayor expresión en mucosas expuesta a alcohol ( $p=0.045$ ) comparado a su homólogo control, así como mayor expresión en las displasias severas y carcinomas comparado con la mucosa control. Por otro lado, PTEN presentó expresión similar en las mucosas histológicamente similares, cambios contrastantes en las DS y COCE BD del grupo D comparado al grupo E, observando diferencia significativa ( $p=0.035$ ) para los carcinomas BD (Cuadro 6 y Fig. 6).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las cifras epidemiológicas y la calidad de vida de los pacientes afectados marcan al Carcinoma Oral de Células Escamosas como un problema de salud pública a nivel mundial. El crecimiento potencial de esta neoplasia se incrementa conforme las personas aumentan su exposición a factores de riesgo tales como el alcohol y el tabaco. Su incidencia y prevalencia varía según la región geográfica y condición socioeconómica. Para los países desarrollados la mayor incidencia del COCE se ve asociada a personas adultas de bajos ingresos, sin embargo, en países en vías de desarrollo, la incidencia y prevalencia son mayores en personas mayores de 40 años con un alto consumo de tabaco y alcohol. Se ha demostrado que el consumo de alcohol puede aumentar de 2-3 veces el riesgo relativo (RR) de desarrollar cáncer oral, de faringe, laringe y esófago. Además el sinergismo en el consumo alcohol-tabaco puede aumentar en 3 el RR para desarrollar displasias y de 15-30 veces el RR para COCE (Barnes, et al., 2005; Globocan, 2008; Scully & Bajan, 2009). Para poder comprender los procesos histológicos, celulares y moleculares de transformación asociados a estos factores de riesgo se puede utilizar modelos *in vitro* o *in vivo*. El modelo hámster sirio dorado es un modelo animal experimental utilizado en el análisis de variaciones epigenéticas, angiogénesis, evasión de la apoptosis y proliferación celular del cáncer oral, diversas investigaciones lo sugieren como el estándar de oro en el estudio de carcinogénesis química oral (Suresh, et al., 2010; Chung, et al., 2009; Letchoumy, et al., 2007; Sun, et al., 2008). Los resultados de este estudio mostraron que solamente los grupos D y E expuestos a DMBA y DMBA/OH, respectivamente, presentaron desarrollos tumorales con similares frecuencias en el número promedio de tumores; no obstante, observamos mayor volumen tumoral en el grupo E. Esto nos confirma el potencial carcinogénico del DMBA, ya que

por sí solo y en conjunción con alcohol fue capaz de inducir tumores, mientras que el mayor volumen tumoral observado en el grupo E puede ser debido a esta conjunción con el alcohol. Este aumento en el volumen puede ser debido al efecto promotor o aumento en la permeabilidad de las mucosas atribuido al alcohol. Se ha demostrado que concentraciones diluidas de alcohol (15%) pueden ser más efectivas en aumentar la permeabilidad de mucosas que concentraciones altas (40%), ya que esta última puede actuar como un fijador químico reduciendo la permeabilidad (Squier, et al., 1986), estos cambios en la permeabilidad pueden permitir mayor acción de los agentes carcinogénicos. Por otro lado, un promotor se puede definir como aquella sustancia que por sí solo no es capaz de producir tumores, sin embargo, al ser usado con un carcinógeno, el número y velocidad de crecimiento tumores puede aumentar (Elzay, 1966), es posible que ambas circunstancias puedan ser responsables de tal resultado, no obstante mayor información para confirmar dichos procesos es requerida.

Para poder confirmar un diagnóstico definitivo de transformación maligna, el análisis histopatológico es fundamental. Al análisis histológico de nuestros grupos controles (A y B) no presentaron cambios al obtener mucosas histológicamente normales en todos los especímenes, la misma conducta fue observada en el grupo C expuesto a etanol al 15%. El grupo D (expuesto a DMBA al 0.5%) presentó especímenes con cambios displásicos y carcinomas invasores, (4 displasias severas y 4 carcinomas BD) confirmando el potencial carcinogénico del hidrocarburo aromático (Manoharan, et al., 2009). Este resultado podría ser comparable al uso crónico de cigarrillos por parte del hombre; donde se ha reportado que los 40ng de DMBA y benzopireno localizados en cada cigarrillo pueden aumentar el riesgo a desarrollar lesiones neoplásicas derivado de la formación de aductos en las células expuestas dichos hidrocarburos (Lee, et al.,

2002; Loeb & Harris, 2008). En el grupo E, donde alcohol y DMBA fueron usados conjuntamente observamos mayor presencia de carcinomas invasores comparado a displasias severas. Esto podría ser debido a los efectos de aumento de la permeabilidad de la mucosa, que permite mayor ingreso del carcinógeno dentro de las células o bien a un potencial promotor del alcohol (Squier, et al., 1986; Elzay, 1966; Morse, et al., 2007; Howie, et al., 2001), no obstante se sugiere que ante la exposición a ambos compuesto el riesgo de desarrollar lesiones de mayor malignidad aumenta. Adicionalmente se consideramos los resultados histológicas del grupo C, donde observamos mucosas normales y ningún desarrollo neoplásico desde el punto de vista histológicos refuerza el concepto de promotor para el alcohol (Helmut & Sticke, 2007; Hennig, et al., 2009). Las posibilidades de estudio, análisis y aplicación en este tipo de modelo animal son amplias, ya que nos puede permitir un ambiente muy parecido al presente en los carcinomas humanos, además de poder analizar de forma secuencial el proceso de transformación desde una mucosa normal hasta un carcinoma invasor, por lo cual el análisis de la asociación directa o indirecta de moléculas de importancia en la oncología como lo son los factores de crecimiento nos podría aportar mayor información sobre dicho proceso.

El análisis de los receptores erbB surge de su utilidad al asociar su expresión con el pronóstico y tratamiento de diferentes neoplasias (Hynes, et al., 2001). Neoplasias tales como carcinoma de mama, colon y pulmón, al igual que en los carcinomas de cabeza y cuello han mostrado a erbB1 y erbB2 como efectores importante en la transformación maligna. Sin embargo, el conocimiento respecto a la conducta de erbB3 y erbB4 en la oncogénesis oral es limitado. La búsqueda de asociaciones directa o indirectas entre la expresión de una sola molécula sin considerar los antecedentes mismos de la lesión, nos puede aportar información incompleta, el



conocer el tipo de sustancia (alcohol o tabaco) utilizada por el paciente, la condición histológica y otras variables (edad, sexo, zona anatómica, etc.) podría complementar la información sobre la conducta molecular, aportando mayor información, lo cual podría repercutir en mejores decisiones respecto al entendimiento, tratamiento o pronóstico del paciente.

Los resultados de la expresión de erbB según su condición histológica nos indicaron cambios en condiciones histológicas similares, ya que en las mucosas del grupo C expuestas a alcohol se observó aumento en la expresión de erbB2, erbB3 y erbB4, comparado a la mucosa control. Esto podría ser un mecanismo de respuesta ante el estrés ambiental generado por el alcohol. Se ha demostrado que el incremento en la permeabilidad de la mucosa expuesta a alcohol puede generar aumento en los niveles de transcripción de moléculas proinflamatorias como IL-1a, IL-1b, TNFa y GM-CSF, lo expresión elevada de los receptores erbB se asocia a un mecanismo de reparación o supervivencia ante este estado, no obstante, el mismo estado crónico de inflamación o bien la presencia adicional de un carcinógeno a largo plazo podría condicionar el desarrollo de una neoplasia (Squier, et al., 1986; Howie, et al., 2001). Las displasias severas histológicamente pueden exhibir proliferación anormal en el estrato basal hasta el tercio superior del epitelio. Los cambios citológicos y arquitecturales pueden ser sumamente prominentes, esto puede generar una población celular heterogénea dentro del tejido, no obstante estos cambios se restringen al epitelio mismo, sin afectar el tejido conjuntivo subyacente (Speight PM, 2007). Al analizar la expresión de los receptores erbB en esta condición histológica observamos diferencias en las DS desarrolladas en el grupo D y E, a pesar de ser clasificadas como displasias, se observó diferencias en la expresión de erbB1, erbB3 y erbB4, únicamente erbB2 presentó un patrón similar en ambos grupos. Las diferencias

en la expresión de erbB1/3/4 podría obedecer a la misma heterogeneidad celular de la condición histológica o bien quizá al efecto provocado por el factor de riesgo químico expuesto, ya que las displasia de grupo D expuesto a DMBA presento disminución de erbB1 y aumento importante de erbB3 y erbB4 respecto al control, mientras que las displasias del grupo E, expuesto a DMBA y alcohol, no presentaron diferencias en erbB1 y aumento discreto de erbB3 y erbB4. El dato a resaltar es la expresión similar de erbB2, este receptor debido a su conformación similar a un estado de activación por ligando, le permite permanecer activado por lo cual puede potenciar un gran número de señales de trasnducción (Fong Y, et al., 2008). Esta característica común en ambas displasias independientemente del grupo experimental, nos sugiere que esta molécula puede participar como un marcador de transformación temprana. Cuando histológicamente observamos invasión del tejido conjuntivo subyacente, además de aumento en los parámetros de displasia el diagnostico de carcinoma es evidente. En los carcinomas bien diferenciados desarrollados en el grupo D y E, al igual que en las displasias, observamos expresión diferencial de erbB1, no obstante, erbB2, erbB3 y erbB4 presentaron aumentos similares y superiores al compararla con la mucosa control. Independientemente del grupo de tratamiento, la similar expresión aumentada de erbB2/3/4 nos sugiere que estas tres moléculas son necesarias para la completa transformación maligna. Se ha reportado que el dímero de erbB2-erbB3 es un indicador del tiempo libre de enfermedad, es decir, el tiempo en el cual el paciente permanece sin recurrencias, mientras que la expresión elevada de erbB4 se ha asociado con metástasis a linfonodos (Sithanandam & Anderson, 2008, de Vicente, et al., 2003). En nuestro modelo experimental, al observar el aumento en la expresión de los tres receptores mencionados, nos podría permitir a futuro el determinar el tiempo libre de

enfermedad y/o la metástasis a linfonodos; ya que estas variables son de suma importancia para la supervivencia del paciente, la comprensión de las misma a través de un modelo experimental tratando de encontrar alternativas para su control o conducta biológica implicada, sería sumamente benéfico.

El análisis inmunohistoquímico para determinar la zona celular de expresión mostró que erbB1 modificó su expresión de membrana en condiciones histológicamente normales a citoplasmática en DS y COCE, mientras que erbB2/3/4 se presentaba un patrón inverso. Lin et al. y Hanada et al. demostraron que erbB1 puede traslocar a citoplasma y núcleo para actuar como factor trascricional de ciclina D1 y Myb-B promoviendo mayor proliferación (Lin, et al., 2001; Hanada, et al., 2006). La localización en membrana de los receptores erbB2/3/4 nos podría sugerir su participación en la señalización intracelular. Se ha reportado que aumento en la densidad de los receptores a nivel de membrana podría generar la autofosforilación del dominio tirosina cinasa, conduciendo a la activación de vías de transducción (Rusnak, et al., 2001). A través de ensayos de inmunoprecipitación analizamos la fosforilación de los receptores erbB, observando que las mucosas del grupo C expuesto a alcohol presentaban mayor fosforilación de los cuatro receptores comparado al control. Esta fosforilación podría conducir a la activación de vías que favorezcan la supervivencia, reparación o soporte del estrés generado por la exposición al alcohol. Se ha reportado que el estado inflamatorio a través de la síntesis y secreción de citosinas que conduzcan al estrés oxidativo y daño celular secundario, así como mecanismos celulares y moleculares que pueden conducir a la transformación maligna (Scully & Bagan, 2009). Las displasias severas de los grupos D y E presentaron mayor fosforilación de erbB2 y erbB3, lo cual nos podría sugerir que este heterodímero, como

responsable temprano de transformación, puesto que al analizar la fosforilación de los carcinomas BD de los grupos mencionados observamos mayor fosforilación en erbB1, erbB2 y erbB4, lo cual nos indica que la expresión y fosforilación de erbB2 es sumamente importante para el desarrollo neoplásicos, la posibilidad de establecer heterodímeros con erbB1, erbB3 y erbB4, podrían ser los responsables de los cambios en la conducta de cada neoplasia (Alroy & Yarden, 1997; Morgan & Grandis, 2009; Rautava, et al., 2008; Xia, et al., 1999; Vairaktaris (b), et al., 2008; Xu, et al., 2010; Zaczek, et al., 2005; Vairaktaris, et al., 2008).

Las diferencias en la expresión y fosforilación de estos receptores es indicio de las vías de transducción activadas, como ya se ha mencionado los receptores erbB pueden iniciar la activación de las MAPK, PI3-AKT y STAT (Morgan & Grandis, 2009), al igual que otras vías asociadas principalmente con la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. La determinación de la expresión de moléculas asociadas a proliferación y la fracción de células proliferantes, es importante por el hecho de que entre mayor número de células se permite la posibilidad adquirir nuevas mutaciones generando poblaciones más heterogéneas, así como tumores clínicamente más grandes. Nuestros resultados indicaron que la expresión de ERK1/2 y principalmente la de p-ERK fue mayor en las mucosas tratadas con alcohol comparado a su homólogo control, lo cual puede ser derivado de la fosforilación de los receptores erbB, principalmente erbB1 y erbB2, los cuales presentan sitios de unión para Grb2, conduciendo a la activación de la vía MAPK. Esta situación refuerza la teoría del alcohol como promotor en la transformación maligna, ya su efecto directo o indirecto en la acción de p-ERK puede generar la proliferación celular a final de término. En este sentido, se ha reportado que la activación de EGFR en carcinomas de cabeza y cuello puede conducir a la iniciación y progresión de esta

neoplasia a través de la señalización por ERK1 y ERK5, conduciendo a las células a un estado proliferativo o de mayor invasividad de células tumorales (Sticht et al., 2008). Al analizar la expresión de ERK1/2 en displasias severas y carcinomas BD observamos similares niveles de expresión en sus homólogos histológicos, no obstante, se expresión fue mayor a la del grupo control, lo cual concuerda con lo reportado (Hennig, et al., 2009, Sticht et al., 2008).

Otras moléculas implicadas en la proliferación es la familia de factores de transcripción c-Fos (FosB, Fra-1y FosB2) y c-Jun (c-Jun, JunB y JunD) ambos tipos de factores puede dimerizar y formar el grupo proteico AP-1, el cual puede unirse a regiones promotoras y/o aumentadoras de la transcripción del ADN. El aumento en la expresión de este complejo ha sido implicado en la carcinogénesis; derivado de la sobreexpresión de este complejo se ha observado la activación de genes implicados la invasión, metástasis, diferenciación, supervivencia y proliferación (Xie, et al., 1999). El análisis de la expresión por inmunohistoquímica nos indicó similares niveles de expresión en condiciones histológicas similares para c-Fos y c-Jun, sin embargo, al analizar su sitio de expresión celular observamos mayor presencia nuclear de c-Fos en mucosas tratadas con alcohol, no así de c-Jun, sugiriendo que la actividad del complejo AP-1 puede depender de otra molécula en la formación del dímero, ya sea JunB o JunD (de Sousa, et al., 2002).

La conjunción en la expresión de p-ERK y AP-1, podría generar un estado o fracción de mayor proliferación celular, así como mayor supervivencia. Para poder determinar el número de células capaces de proliferar dentro de una muestra utilizamos al anticuerpo Ki-67; el cual determina la fracción de células ciclantes (G1, S o G2). Nuestros resultados indicaron que las DS y COCE del grupo E, expuesto a alcohol y DMBA, presentaron mayor número de células positivas comparado a condiciones histológicas similares del grupo D y el grupo control; en el

análisis estadístico observamos una correlación estadísticamente significativa entre el volumen tumoral y la cantidad de células Ki-67 positivas ( $p=0.039$ ); esta asociación nos sugiere que los tumores de mayor tamaño pueden presentar mayor tasa de proliferación. Se ha reportado que esta molécula puede ser considerada como marcador del riesgo de recurrencia, resistencia al tratamiento y cancerización de campo (Faratzis, et al., 2009; Montebugnoli, et al., 2009), si consideramos que el tamaño tumoral es una variable clínica utilizada en el pronóstico neoplásico, la determinación conjunta del número de células Ki-67 positivas en tumores humanos nos podría aportar mayor información respecto a la posible conducta del carcinoma oral, ya que sería interesante el poder determinar qué moléculas fueron responsables directas o indirectas del aumento en el número de células con potencial proliferativo. En base a nuestros resultados parece ser que p-ERK tiene mayor participación de este fenómeno ya que presenta un patrón similar ante la exposición al alcohol.

Dentro de las características comunes del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg, la autosuficiencia de señales positivas, insensibilidad a señales inhibitorias y evasión de apoptosis, son características que se deben considerar para poder establecer el perfil de proliferación, conducta y agresividad de la neoplasia (Hanahan & Weinberg, 2000). En este estudio analizamos la expresión de AKT, NF- $\kappa$ B y PTEN, moléculas asociadas con dichas conductas. La familia AKT consiste en tres isoformas, las cuales conservan sus residuos de serina y treonina fosforilables permitiéndole con esto la interacción con otras moléculas asociadas (PI3K o NF- $\kappa$ B) y así participar en fenómenos proliferativos o anti-apoptóticos (Gonzalez & McGraw, 2009; Massarelli, et al., 2005). No obstante, la presencia de la forma fosforilada de AKT depende de la presencia de la fosfatasa PTEN. Los fosfoinosítidos generados por PI3K pueden ser rápidamente

metabolizados por esta fosfatasa, la cual, ante mutaciones o cambios epigenéticos puede ser inactivada en una gran fracción de tumores humanos generando un actividad constitutiva de AKT (Sulis & Parsons, 2003, Lee, et al., 2001). Al analizar nuestros resultados observamos que la expresión de AKT no presento cambios; no así p-AKT, cuya expresión fue mayor en mucosas tratadas con alcohol comparado a sus homólogos control, esto nos podría sugerir mayor actividad de esta molécula ante la exposición a dicha sustancia. Massarelli y Cols. han sugerido que la activación de AKT puede correlacionar con la transformación de epitelio normal a displasia y así iniciar un carcinoma (Massarelli, et al., 2005). En nuestros resultados la expresión de p-AKT en DS y carcinomas BD fue similar a la expresada por mucosas expuestas a alcohol, lo cual podría ser indicio de lo antes mencionado. No obstante, debemos considerar que para una transformación maligna se requiere de un mayor número de alteraciones, sin embargo, la expresión de p-AKT, al igual que la alteración en los receptores erbB y p-ERK observados en este modelo experimental ya ha sido reportado de forma separada en el ser humano (Massarelli, et al., 2005; Hynes, et al., 2001; Sticht et al., 2008), por lo cual si se lograra observar hallazgos conjuntos similares en le humano, las posibilidades de este modelo aumentarían. Se sabe que en la vía de transducción de AKT, el gen supresor tumoral PTEN, localizado en el cromosoma 10q23, juega un papel muy importante, así como su disminución en los niveles de expresión se ha asociado en diferentes neoplasias, incluyendo a los carcinomas orales (Sulis & Parsons, 2003, Kurasawa Y, et al., 2008). Nuestros resultados indicaron disminución solo en las displasias severas y carcinomas BD del grupo D. Este dato presento una relación inversa con el aumento observado en NF- $\kappa$ B, en dichas condiciones histológicas. La disminución de PTEN y aumento de NF- $\kappa$ B, podría ser consecuencia de la actividad constante de AKT, lo cual podría permitir la

inducción de proliferación, supervivencia, invasión, angiogénesis, metástasis, así como la inhibición de apoptosis y resistencia ante agentes quimio y/o radioterapéuticos (Brown, et al., 2008; Massarelli, et al., 2005; Sulis & Parsons, 2003).

La expresión de NF- $\kappa$ B ha sido implicada en procesos tales como el desarrollo, cicatrización, inflamación y en la patogénesis del cáncer (Brown, et al., 2008), su activación clásicamente ha sido ligada a TNF- $\alpha$ , IL-1, LPS bacteriano y recientemente a la activación de receptores de factores de crecimiento, como EGFR. Se ha reportado que la exposición a nicotina y carcinógenos del tabaco puede inducir la activación de NF- $\kappa$ B, promoviendo proliferación y supervivencia celular, esto nos sugeriría por qué observamos cambios en los especímenes de grupo D, expuesto únicamente a DMBA, un carcinógeno del tabaco (Brown, et al., 2008).

La conjunción de señales de transducción en el COCE es un fenómeno común en muchos tipos de neoplasias, sin embargo, este es el primer estudio experimental en el cual se sugiere la participación del factor de riesgo (alcohol y DMBA) y condición histológica como parte importante en la conducta celular y molecular de la neoplasia, principalmente asociada a proliferación. Con nuestros resultados podemos sugerir que la sobreexpresión y fosforilación de erbB2, erbB3 y erbB4 puede ser observada en la mucosa expuesta a alcohol, displasias y carcinomas; sugiriendo a erbB2 como baluarte de la transformación maligna ya que se presentó tanto en displasia como carcinomas, postulándolo como posible marcador de transformación maligna oral. La mayor expresión de p-ERK y c-Fos a nivel nuclear, así como el mayor número de células Ki-67 positivas nos indica un gran potencial proliferativo, principalmente cuando existe exposición a alcohol. Así mismo, la interesante relación en la expresión p-AKT, PTEN y NF- $\kappa$ B, principalmente en las mucosas tratadas con alcohol y displasias y carcinomas BD inducidos por



DMBA, requiere de mayor investigación para poder determinar su participación y función, ya sea como un mecanismo de adaptación, evasión de apoptosis, inhibición de genes supresores o asociación con proliferación.

La búsqueda de marcadores únicos o totales que sean capaces de determinar de forma clara y contundente la conducta del cáncer es un hecho de investigación constante, sin embargo, el entender que la carcinogénesis es un evento múltiple, nos lleva a pensar la posibilidad de utilizar varios marcadores para este fin. En este estudio analizamos a factor de riesgo (DMBA y alcohol), la condición histológica y la expresión de ciertas moléculas principalmente enfocadas a la proliferación, la investigación de otros parámetros básicos en la conducta de neoplasia pueden ser abordados, por lo que una mayor investigación básica en la oncología oral siempre será requerida.

## REFERENCIAS

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997;410(1):83-6.

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.

Andrejevic S, Savary JF, Fontolliet C, Monnier P, van Den Bergh H. 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced 'early' squamous cell carcinoma in the Golden Syrian hamster: evaluation of an animal model and comparison with 'early' forms of human squamous cell carcinoma in the upper aero-digestive tract. *Int J Exp Pathol.* 1996;77(1):7-14.

Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.* 2007;8 (4):292-3.

Barnes L, Evenson JW, Rihad D, Sidransky D. Pathology and genetic of Head and neck tumours. WHO. 2005. Chapter 4. Tumours of the oral cavity and oropharynx; 168-175.

Betancourt M. C.C.-RHM-01 MORTALIDAD y MORBILIDAD Compendio de Cáncer 2001. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaria de Salud.

Bianchini F, Boeing H, Vineis P, Elmstahl S, Martinez-Garcia C, van Kappel AL, et al. Alcohol consumption and oxidative damage. *IARC Sci Publ.* 2002;156:163-4.

Brown M, Cohen J, Arun P, Chen Z, Van Waes C. NF-kappaB in carcinoma therapy and prevention. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(9):1109-22.

Chung YL, Lee MY, Pui NN. Epigenetic therapy using the histone deacetylase inhibitor for increasing therapeutic gain in oral cancer: prevention of radiation-induced oral mucositis and inhibition of chemical-induced oral carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009 Aug;30(8):1387-97.

Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med*. 2004;38(5):613-9.

de Laat SW, Boonstra J, Defize LH, Kruijer W, van der Saag PT, Tertoolen LG. et al. Growth factor signalling. *Int J Dev Biol*. 1999;43(7):681-91.

de Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(2):78-81.

de Vicente JC, Esteban I, Germanà P, Germanà A, Vega JA. Expression of ErbB-3 and ErbB-4 protooncogene proteins in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Med Oral*. 2003;8(5):374-81.

Dipple A. Formation, metabolism, and mechanism of action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res*. 1983;43(5 Suppl):2422s-2425s.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4309-13.

Elzay RP. Local effect of alcohol in combination with DMBA on hamster cheek pouch. *J Dent Res*. 1966;45(6):1788-95.

Faratzis G, Tsiambas E, Rapis AD, Machaira A, Xiromeritis K, Patsouris E. VEGF and ki 67 expressions in squamous cell carcinoma of the tongue: An immunohistochemical and computerized image analysis study. *Oral Oncol*. 2009;45(7):584-8.

Fong Y, Chou SJ, Hung KF, Wu HT, Kao SY. An investigation of the differential expression of Her2/neu gene expression in normal oral mucosa, epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 2008;71(3):123-7.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92: 709-20.

Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, IARC, WHO, como: <http://globocan.iarc.fr/>

Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2009;8(16):2502-8.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):361-70.

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1697(1-2):3-16.

Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog.* 2006;45(1):10-7.

Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100: 57-70.

Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, *et al.* Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(22):1698-705.

Helmut S, Sticke F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2007: 599-612.

Hennig M, Yip-Schneider MT, Klein P, Wentz S, Matos JM, Doyle C, et al. Ethanol-TGF alpha-MEK signaling promotes growth of human hepatocellular carcinoma. *J Surg Res.* 2009;154(2):187-95

Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis.* 2001;7(6):349-54.

Hynes NE, K Horsch, M A Olayioye. The ErbB receptor tyrosine family as signal Integrators. *Endocrine-Related Cancer* 2001; 8: 151–159.

Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, Malagón H, Hernández-Guerrero JC. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005 Feb;73(2):65-71.

Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, Lundin J, Tanner M, Härkönen P, et al. Cleavable ErbB4 isoform in oestrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(4):1384-93.

Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, Gebhart E, Efferth T. Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7(3):317-29.

Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, Fushimi K, Ishigami T, Bukawa H, et al. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008;19(6):1429-34.

Lam E, Kelley E, Martin S. Detection and cloning of potent transforming gene(s) from chewing tobacco-related human oral carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncology* 1994;30B(4):268-77.

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127(12):1441-5.

Lee LL, Lee JS, Waldman SD, Casper RF, Grynblas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone.* 2002;30(6):917-23.

Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a simple of cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol.* 1998;34:347-52.

Letchoumy PV, Mohan KV, Prathiba D, Hara Y, Nagini S. Comparative evaluation of antiproliferative, antiangiogenic and apoptosis inducing potential of black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *J Carcinog.* 2007;6:19.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):802-8.

Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.* 2008;68(17):6863-72.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Luch A. Nature and Nurture Lessons from Chemical Carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2005; 5: 113-125.

Ludwing JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Rev.* 2005;5:845-56.

Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, Reena AR. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J.* 2009;50(2):139-46.

Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer.* 2005;104(11):2430-6

Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):417-24.

Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 2009;8(8):1168-75

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19:550- 65.

Mishra A, Bharti AC, Saluja D, Das BC. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(4):819-29.

Montebugnoli L, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A, Foschini MP. Prognostic value of Ki67 from clinically and histologically 'normal' distant mucosa in patients surgically treated for oral squamous cell carcinoma: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(11):1165-72.

Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res*. 2009;315(4):572-82.

Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res*. 1961;40:3-15.

Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, Cohen D, Mohit-Tabatabai M, Kosis DL, Eisenberg E. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes Control*. 2007;18(9):919-29.

Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health*. 2006;29(3):193-8.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004;15(9):1319-29.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa 2<sup>nd</sup> Edition, 1997 WHO, Springer.

Rautava J, Jee KJ, Miettinen PJ, Nagy B, Myllykangas S, Odell EW, Soukka T, et al. ErbB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol*. 2008;44(3):227-35.

Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG, Stubberfield C, Harris R, Page M, et al. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res*. 2001;61(19):7196-203.

Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol*. 2000;36(3):267-71.

Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, Lax I, Libermann T, Yarden Y. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *Rev Biochem* 1983;14:93-111.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009;15(6):388-99.

Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):599-612.



Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(7):413-48.

Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol.* 2007 Sep;1(1):61-6

Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol.* 1986;15(5):276-9.

Stewart BW, Kleihues P. World cancer report, Lyon: WHO International Agency for Research on Cancer; 2003.

Sticht C, Freier K, Knöpfle K, Flechtenmacher C, Pungs S, Hofele C, et al. Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Neoplasia.* 2008;10(5):462-70.

Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 2003 Sep;13(9):478-83.

Sun Z, Sood S, Li N, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[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 Oncol.* 2008;44(7):652-7.

Suresh K, Manoharan S, Vijayaanand MA, Sugunadevi G. Chemopreventive and antioxidant efficacy of (6)-paradol in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Pharmacol Rep.* 2010;62(6):1178-85.

Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* 2006;97(8):697-702.

Vairaktaris E (b), Goutzanis L, Vassiliou S, Spyridonidou S, Nkenke E, Papageorgiou G, et al. Enhancement of erbB2 and erbB3 expression during oral oncogenesis in diabetic rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(3):337-44.

Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol*. 2008;44(4):315-24.

Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, et al. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005;24(22):3574-82.

Wangsa D, Ryott M, Avall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J, et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *Br J Cancer*. 2008;99(7):1121-8.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res*. 1999;5(12):4164-74.

Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1999;35(5):502-9.

Xu M, Bower KA, Chen G, Shi X, Dong Z, Ke Z, Luo J. Ethanol enhances the interaction of breast cancer cells over-expressing ErbB2 with fibronectin. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(5):751-60.

Yang Y, Zhou ZT. Effect of genistein on DMBA induced oral carcinogenesis in hamster *Carcinogenesis* 2006;27 (3): 578–583.

Yoshida T, Kinoshita H, Segawa T, Nakamura E, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O. Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate

cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res.* 2005;65(21):9611-6.

Zaczek A, Brandt B, Bielawski KP. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol.* 2005;20(3):1005-15.

## APÉNDICE A. CUADROS

Grupo	Peso promedio (g)	Consumo de alcohol 15%	Frecuencia media de tumores	Volumen Tumoral (mm <sup>3</sup> )
<b>A (Control NT)</b>	96.3	0	0	0
<b>B (Control AM)</b>	106.95	0	0	0
<b>C (OH 15%)</b>	103.25	0	0	0
<b>D (DMBA 0.5%)</b>	89.6	20.4	3.28	15.40mm <sup>3</sup>
<b>E (DMBA-OH)</b>	100.15	18.9	2	84.69mm <sup>3</sup>

El peso, consumo medio de alcohol y frecuencia media de tumores presentaron valores similares, no obstante, respecto al volumen tumoral observamos diferencia entre el grupo D y E, lo cual podría ser atribuido al efecto conjunto de DMBA y alcohol. NT: No tratado, AM: Aceite mineral, OH: alcohol, DMBA: 7-12 dimetilbenza(a)anthraceno.

Grupo A (Control NT)	Grupo B (Control AM)	Grupo C (OH 15%)	Grupo D (DMBA 0.5%)	Grupo E (DMBA-OH)
10 mucosas normales	10 mucosas normales	10 mucosas normales	4 DS 4 COCE BD	2 DS 5 COCE BD 1 COCE MD 1 COCE PD

Los grupos A, B y C presentaron mucosas histológicamente normales, no así los grupos D y E, lo cual confirma el potencial carcinogénico del DMBA, no obstante, observamos mayor número de carcinomas en el grupo E. DS: displasia severa, COCE: carcinoma oral de células escamosas, BD: Bien diferenciados, MD: Moderadamente diferenciados, PD: Pobrememente diferenciado.

	Mucosa A	Mucosa B	Mucosa C	DS-D	DS-E	COCE BD-D	COCE BD-E	COCE MD-E	COCE PD-E
<b>erbB1</b>	87.24 (15.22)	90.13 (17.94)	90.15 (18.23)	40.22 (8.57)	98.12 (27.94)	81.19 (13.65)	48.35 (8.16)	89.15 (25.17)	65.05 (16.34)
<b>erbB2</b>	20.27 (8.25)	28.88 (7.98)	78.33 (16.64)	45.25 (19.41)	39.35 (18.58)	50.17 (29.28)	76.92 (13.24)	89.93 (25.83)	94.9 (16.73)
<b>erbB3</b>	24.75 (5.37)	19.25 (7.86)	81.16 (8.46)	100.17 (12.53)	54.06 (7.38)	97.45 (15.49)	117.19 (16.29)	84.12 (9.19)	38.28 (8.29)
<b>erbB4</b>	50.91 (15.87)	63.72 (12.29)	98.22 (6.54)	90.2 (18.64)	48.06 (7.53)	95.36 (15.48)	127.45 (27.94)	77.41 (37.11)	73.45 (19.32)

Análisis de la expresión de erbB en condiciones histológicas similares observamos que erbB2, erbB3 y erbB4 presentaban mayor expresión en las mucosas expuesta a alcohol. Las displasias severas presentaron expresión similar en erbB2, por el contrario los carcinomas BD únicamente variaron la expresión de erbB1. Esta conducta de expresión podría ser utilizada como marcadores de transformación maligna.

<b>Cuadro 4. Expresión por zona celular de los receptores erbB.</b>										
		Mucosa A	Mucosa B	Mucosa C	DS-D	DS-E	COCE BD-D	COCE BD-E	COCE MD-E	COCE PD-E
erbB1	M	+++	+++	+++	+	++	+	-	++	-
	C	+	+	+	+++	++	+++	+++	++	+++
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erbB2	M	-	-	-	+	+	+	+	-	+
	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erbB3	M	-	-	+	-	++	++	-	-	-
	C	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erbB4	M	-	-	++	++	+	+	+	-	+
	C	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c-Jun	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	N	-	-	+	+	+	+	+	+	+
c-Fos	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	N	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
NF-κB	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	N	-	-	-	+	-	++	-	-	-

La expresión de los receptores erbB indico el cambio de erbB1 a expresión citoplasmática, mientras los otros tres receptores incrementaban su expresión en membrana. c-Jun y c-Fos presentaron mayor expresión a nivel nuclear, sugiriendo su posible actividad inductora de proliferación. Escala semicuantitativa: - = 0% células, + = 1-29% de las células, ++ = 30-69% de las células y +++ = >70 % de las células. M=membrana, C= citoplasma, N= núcleo.

<b>Cuadro 5. Expresión de c-Jun, c-Fos, Ki-67, NF-κB</b>				
Condición Histológica	c-Jun	c-Fos	Ki-67	NF-κB
Normal (A)	84.99 ± 21.24	50.2±14.2	2.12(±0.3)	58.19±11.15
Normal (B)	82.35±9.67	42.8 ± 11.5	3.7 (1.1)	66.37±9.03
Normal (C)	79.25±11.91	47.3 ± 16.5	5.87(±2.17)	129.56±11.16
Displasia Severa (D)	139.05±12.63	89.1 ± 17.8	7.10 (±2.7)	64.14±7.34
Displasia Severa (E)	168.42 ± 24.25	70.1 ± 16.2	22.6(±10.15)	54.32±5.98
COCE BD (D)	177.35±20.40	59.6 ± 16.3	3.24(±1.52)	137.77±13.12
COCE BD (E)	142.76 ± 18.26	81.4 ± 20.4	17.94(±7.11)	78.09±14.95
COCE MD (E)	88.63 ± 17.42	68.5 ± 17.1	32.50(±8.5)	43.45±5.99
COCE PD (E)	137.8 ± 21.01	78.1 ± 9.7	28.23(±12.5)	40.89±6.24

Determinación de la expresión a través del software IMAGE Lab. c-Jun mostró aumento en su expresión en displasias severas y carcinomas comparado al control, c-Fos no presento cambios. Ki-67 indico mayor número de células positivas en las condiciones histológicas tratadas con DMBA y alcohol. NF-κB presento aumentos importantes en las mucosas normales expuestas a alcohol y los carcinomas BD.Promedio (DE) en uo/μm<sup>2</sup>.

<b>Cuadro 6. . Expresión densitométrica de Western Blots de ERK, AKT y PTEN según su condición histológica</b>					
<b>Condición Histológica</b>	<b>p-ERK</b>	<b>ERK1/2</b>	<b>p-AKT</b>	<b>AKT</b>	<b>PTEN</b>
<b>Normal (A)</b>	44.07 (7.14)	80.89 (8.44)	42.87 (10.9)	96.26 (15.51)	85.81 (8.94)
<b>Normal (B)</b>	50.15 (5.17)	76.97 (11.19)	39.12 (7.82)	90.45 (13.49)	79.24 (16.52)
<b>Normal (C)</b>	107.96 (8.05)	150.1 (13.45)	70.62 (3.22)	89.17 (13.77)	63.4 (5.49)
<b>Displasia Severa (D)</b>	77.95 (17.26)	142.02 (8.43)	79.54 (15.53)	87.66 (12.90)	65.65 (3.13)
<b>Displasia Severa (E)</b>	97.59 (4.27)	134.34 (13.36)	78.13 (18.36)	89.34 (12.25)	91.85 (13.55)
<b>COCE BD (D)</b>	90.6 (8.69)	136.23 (6.7)	74.71 (4.33)	89.01 (13.5)	55.3 (8.8)
<b>COCE BD (E)</b>	75.94 (16.11)	132.93 (14.59)	86.88 (8.28)	109.89 (17.64)	102.99 (10.6)
<b>COCE MD (E)</b>	137.74 (5.72)	139.41 (15.36)	83.61 (11.26)	106.23 (21.21)	68.41 (16.98)
<b>COCE PD(E)</b>	85.19 (27.35)	162.22 (31.73)	82.2 (4.06)	102.92 (21.04)	74.56 (12.17)

La expresión de ERK ½ y p-ERK fue mayor en las mucosas expuestas a alcohol (C), displasias y carcinomas. AKT no presento cambios en su expresión, no así su versión fosforilada que presento un patrón similar a ERK 1/2. PTEN presento disminuciones importantes en las mucosas tratadas con alcohol y los carcinomas BD del grupo D.

## APÉNDICE B. FIGURAS

Figura 1

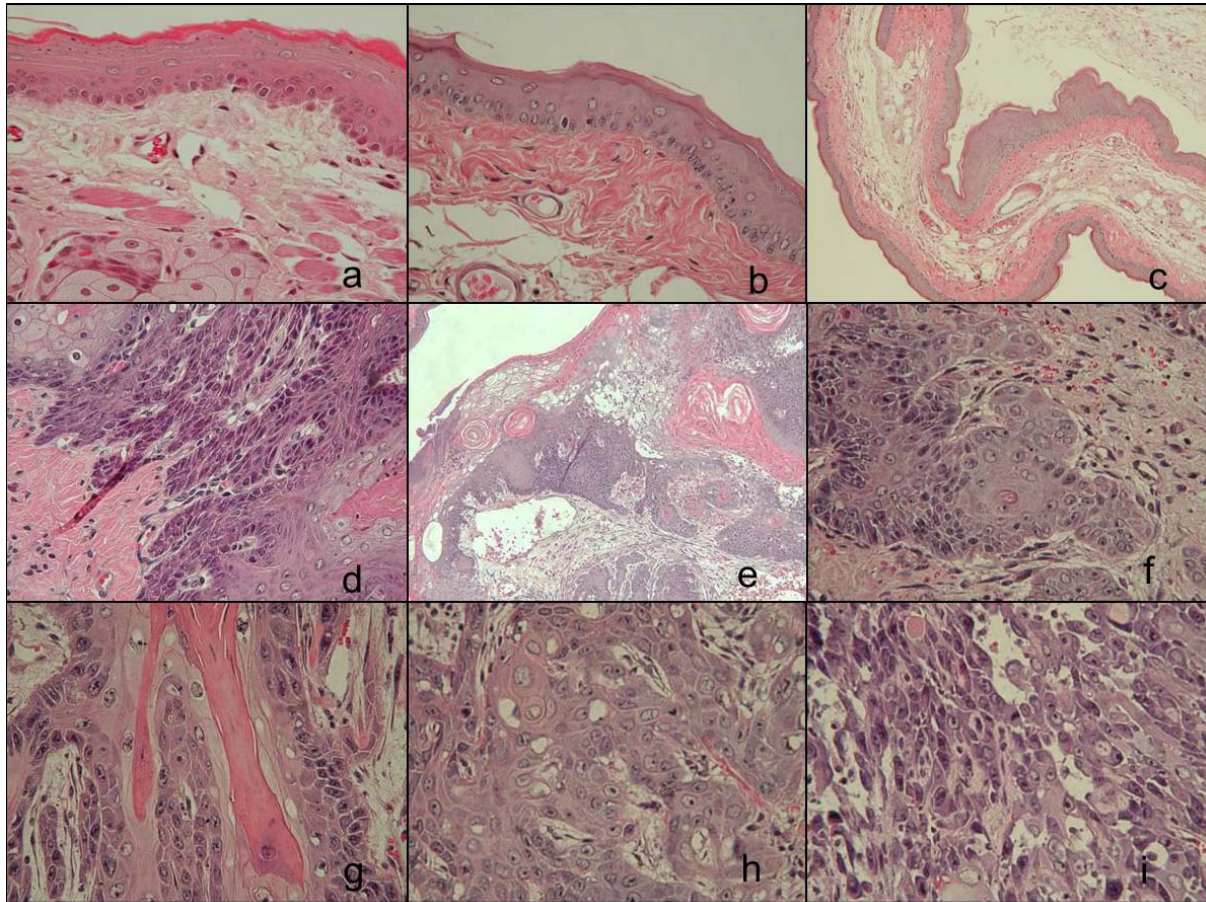


Figura 1. Análisis histológico de grupos controles y experimentales. a) Mucosa normal grupo A, b) Mucosa normal grupo B, c) Mucosa normal grupo C, d) Displasia Severa grupo D, e) COCE BD grupo D, f) Displasia severa grupo E, g) COCE BD grupo E, h) COCE MD grupo E y i) COCE PD grupo E. Las mucosas de los grupos A, B y C fueron clasificadas como normales, se observó un epitelio estratificado queratinizado, con un tejido conjuntivo subyacente fibroso. En los grupos D y E observamos displasias severas y carcinomas invasores, lo cual puede ser atribuido al potencial carcinogénico del DMBA. . Grupo A: Control no tratado, B: control aceite mineral, C: expuesto a alcohol al 15%, D: expuesto a DMBA 0.5% y E: expuesto a alcohol y DMBA. Imágenes a, b y d-i aumento 40X, imagen c 10X.

**Figura 2**

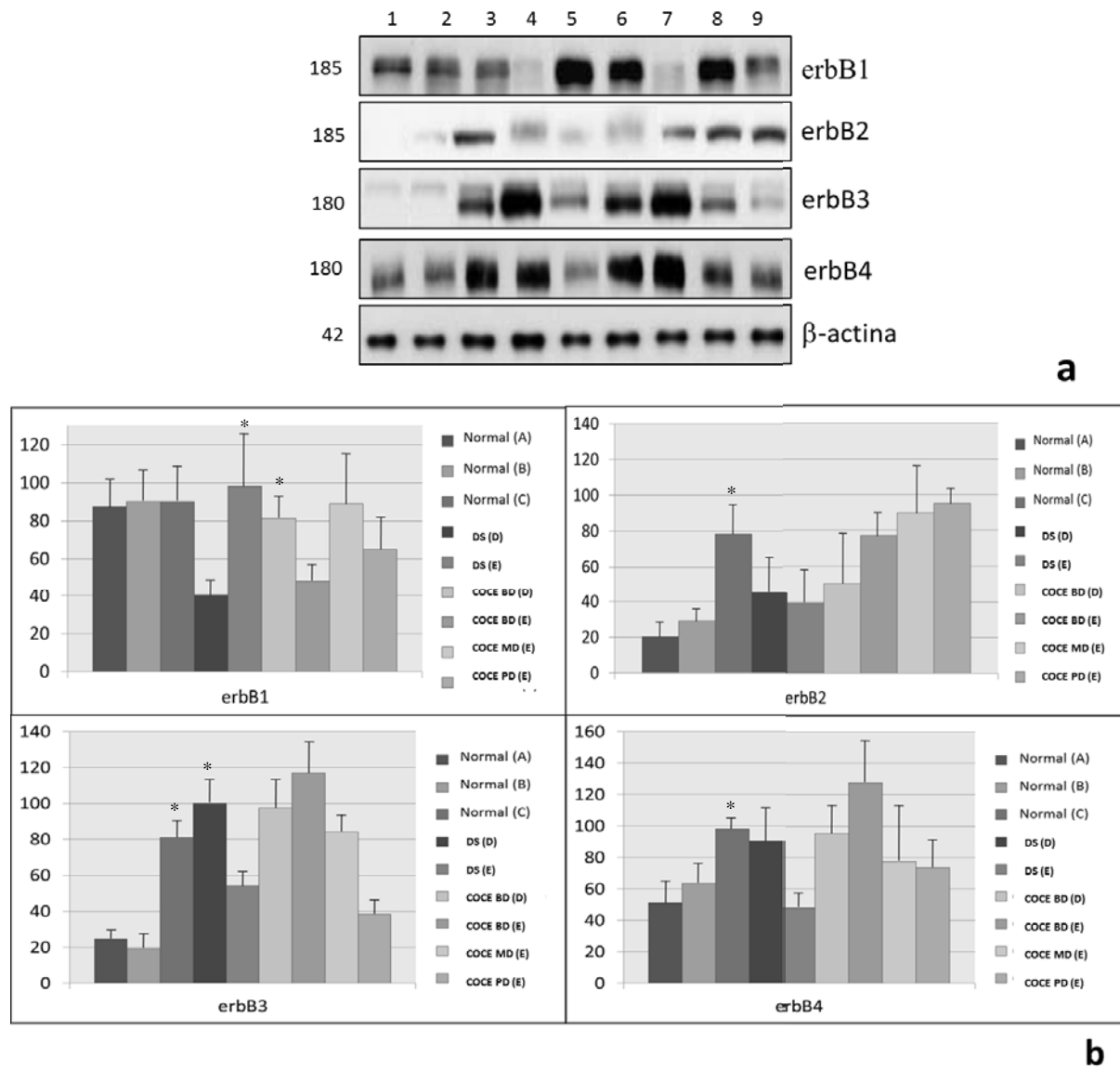


Figura 2. Análisis de la expresión de los receptores erbB a) análisis de Western Blot para los cuatro receptores erbB donde 1: Mucosa grupo A, 2: Mucosa grupo B, 3: Mucosa grupo C, 4: Displasia severa grupo D, 5: Displasia grupo E, 6: Carcinoma BD grupo D, 7: Carcinoma BD grupo E, 8: Carcinoma MD grupo E Y 9: Carcinoma PD grupo E. b) Representación gráfica de medición densitométrica a través del software Un Scan It Gel. Comparación de condiciones histológicas similares. Las mucosas expuestas a alcohol presentaron aumento significativo de erbB2, erbB3 y erbB4. Las Displasias severas mostraron diferencias significativas en erbB1 y erbB3. Los carcinomas solo presentaron diferencias significativas en erbB1. \* p<0.05 Prueba de U Mann-Whitney.



**Figura 3.**

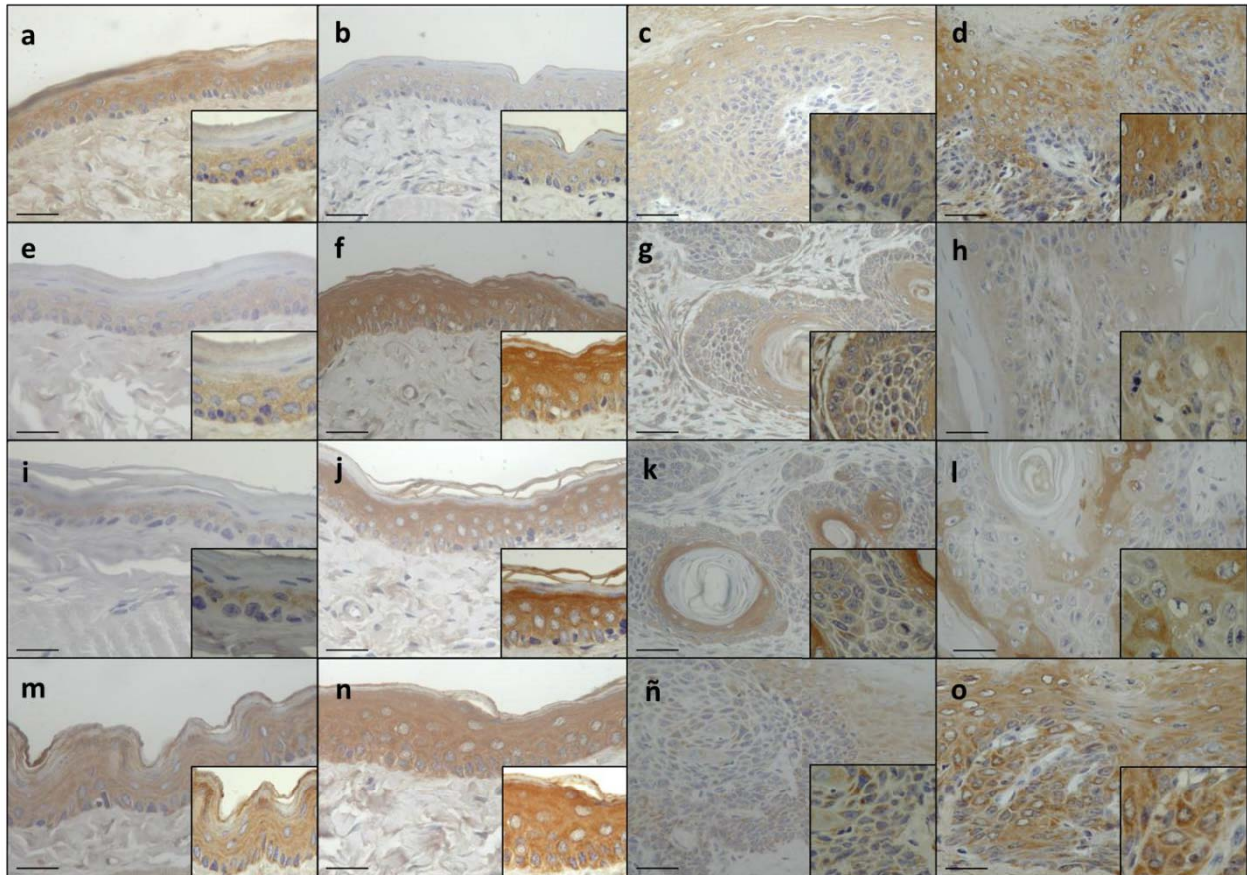


Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de los receptores erbB. a) erbB1 mucosa-A, b)erbB1 mucosa-C, c) erbB1 DS-D, d) erbB1 DS-E, e) erbB2 Mucosa-A, f) erbB2 Mucosa-C, g) erbB2 COCE BD-D, h) erbB2 COCE BD-E, i) erbB3 mucosa-A, j) erbB3 mucosa-C, k) erbB3 COCE BD-D, l) erbB3 COCE BD-E, m) erbB4 Mucosa-A, n) erbB4 Mucosa-C, ñ) erbB4 DS-D y o) erbB4 DS-E. La zona celular de expresión de los receptores erbB cambio según la condición histológica. erbB1 presento mayor expresión a nivel de citoplasma en displasias severas y carcinomas BD (a-d). erbB2 aumento su expresión en mucosas expuestas a alcohol y carcinomas comparado al control (e-f), erbB3 presentó aumento de los grupos experimentales (i-l) y erbB4 presento un patrón similar a erbB2 y erb3. Grupo A: Control no tratado, B: control aceite mineral, C: expuesto a alcohol al 15%, D: expuesto a DMBA 0.5% y E: expuesto a alcohol y DMBA. Imágenes a 40x, recuadro inferior derecho a 100x. Barra= 20µm.

**Figura 4**

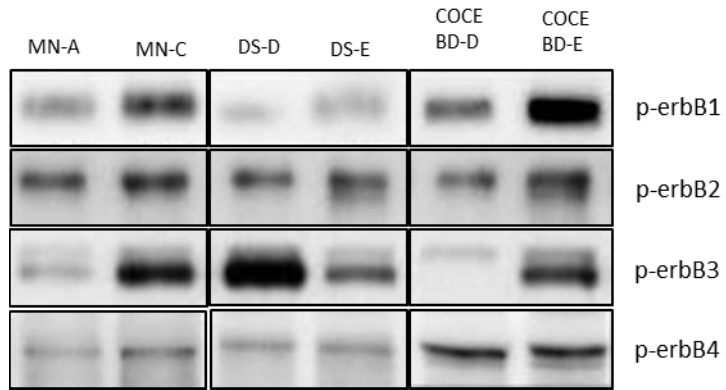


Figura 4. Inmunoprecipitación de receptores erbB. MN-A: Mucosa histológicamente normal del grupo A, MN-C: Mucosa histológicamente normal del grupo C, DS-D: Displasia severa del grupo D, DS-E: Displasia severa del grupo E, COCE BD-D: Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado del grupo D y COCE BD-E: Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado del grupo E. Mayor fosforilación fue observada en las mucosas tratadas con alcohol para erbB1, erbB2 y erbB3, la fosforilación de erbB2 fue constante en displasias y carcinomas BD, erbB1, erbB3 y erbB4 presentaron cambios en estas mismas condiciones histológicas.



**Figura 6**

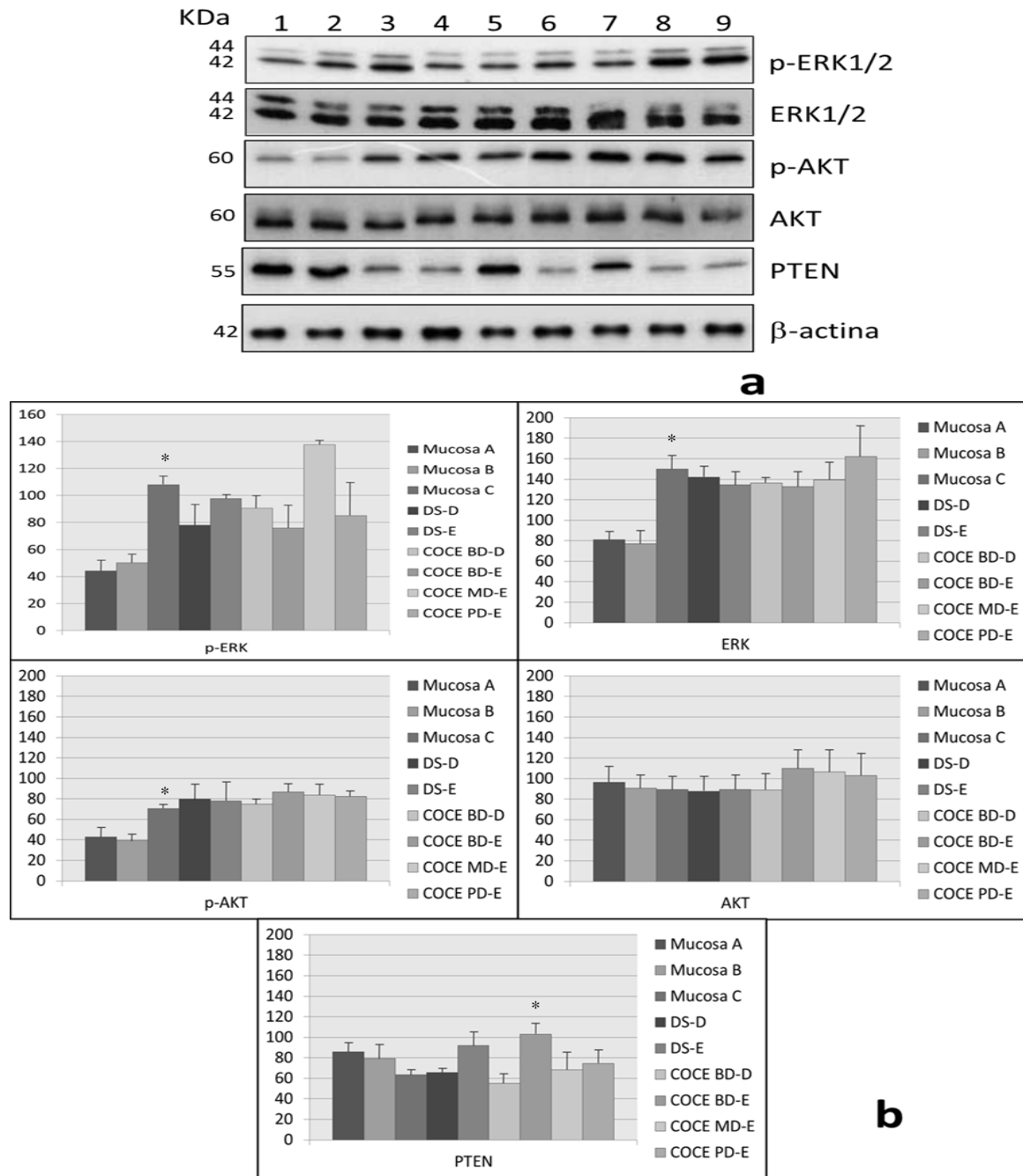


Figura 6. Análisis de la expresión de ERK1/2, AKT y PTEN a) análisis de Western Blot para las proteínas p-ERK, ERK1/2, p-AKT, AKT y PTEN, donde 1: Mucosa grupo A, 2: Mucosa grupo B, 3: Mucosa grupo C, 4: Displasia severa grupo D, 5: Displasia grupo E, 6: Carcinoma BD grupo D, 7: Carcinoma BD grupo E, 8: Carcinoma MD grupo E Y 9: Carcinoma PD grupo E. b) Representación gráfica de medición densitométrica a través del software Un Scan It Gel. Observamos que ERK1/2, p-ERK y p-AKT presentaron cambios significativos en las mucosas histológicamente sanas, mientras que PTEN presenta diferencias estadísticamente significativas en los carcinomas BD, sin embargo observamos diferencias importantes en las displasias severas. \*  $p < 0.05$  Prueba de U Mann-Whitney.