



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO (VPH) Y LA EXPRESIÓN DEL FACTOR
TRANSCRIPCIONAL AKNA CON EL DESENLACE CLÍNICO DE
PACIENTES CON CÁNCER DE OROFARINGE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA LAURA CÁRDENAS VALLARTA



**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOAQUÍN MANZO MERINO
CONACyT- Instituto Nacional de Cancerología**

CIUDAD DE MÉXICO, 2021



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.

190131/0110

FORMATO PARA REGISTRO DE OPCIÓN DE TITULACIÓN (BIOLOGÍA)
Este documento puede ser llenado en computadora utilizando Acrobat Reader

OPCIÓN SOLICITADA			
<input checked="" type="checkbox"/> TESIS			<input type="checkbox"/> TRABAJO PROFESIONAL
<input type="checkbox"/> ACTIVIDAD DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN			<input type="checkbox"/> ESTUDIOS DE POSGRADO
<input type="checkbox"/> SEMINARIO DE TITULACIÓN			
DATOS DEL ESTUDIANTE			
Cárdenas	Vallarta	Diana Laura	
Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)	
BIOLOGÍA			312079477
Carrera			Número de cuenta
54404389	5556280400 Ext:31025	5512603345	
Teléfono domicilio	Teléfono oficina	Teléfono celular	
lauracardenas@ciencias.unam.mx		didig398@gmail.com	
Correo electrónico 1		Correo electrónico 2	
DATOS DEL TUTOR			
Dr.	Joaquin	Manzo	Merino
Grado	Nombre(s)	Apellido Paterno	Apellido Materno
Instituto Nacional de Cancerología			
Dependencia UNAM o empresa en la que trabaja			
5570254930	5556280400 Ext:31025	5541072014	
Teléfono domicilio	Teléfono oficina	Teléfono celular	
jmanzome@conacyt.mx		jmanzomerino@gmail.com	
Correo electrónico 1		Correo electrónico 2	
DATOS DE LA INSTITUCIÓN EN LA QUE LLEVÓ A CABO EL TRABAJO PROFESIONAL O EL SERVICIO SOCIAL			
Instituto Nacional de Cancerología		20-agosto-2018 al 20 de febrero del 2019	
Institución		Periodo en el que realizó la actividad	
TÍTULO TENTATIVO DEL TRABAJO ESCRITO			
Asociación de la presencia del Virus del Papiloma humano (VPH) y la expresión del factor transcripcional AKNA con el desenlace clínico de pacientes con cáncer de orofaringe			
FIRMAS			
Firma del Alumno		Firma del Tutor	
DICTAMEN			
APROBADO <input checked="" type="checkbox"/> 01 FEB 2019	 Dr. Juan José Morrón Lupi Coordinador del Comité Académico de la Licenciatura en Biología		Para todas las opciones de titulación, este registro debe entregarse junto con el proyecto y los documentos probatorios indicados en la sección "Anexos"
CONDICIONADO <input type="checkbox"/>			
RECHAZADO <input type="checkbox"/>			

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA EN BIOLOGÍA



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la supervisión del Dr. Joaquín Manzo Merino. Este proyecto fue apoyado por el Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto: (018/037/IBI) (CEI/1284/18).

El comité revisor estuvo conformado por:

Dr. Vicente Madrid Marina

Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CIESEI), Instituto Nacional de Salud Pública.

Dr. Leonardo Josué Castro Muñóz

UNAM / Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Marco Alonso Andonegui Elguera

UNAM, Facultad de Ciencias / Instituto Nacional de Cancerología.

M. en C. Abril Navarrete Mena

Unidad Periférica de Investigación, Instituto Nacional de Cardiología.

Dr. Joaquín Manzo Merino

CONACyT- Instituto Nacional de Cancerología.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en la 5ta reunión Anual del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer realizado en Puebla de Zaragoza en el mes de septiembre de 2018 con el trabajo titulado "*La expresión de AKNA está disminuida en cáncer de orofaringe positivo a VPH*"; en el 4to Congreso AMIINSHAE celebrado en el mes de noviembre en la Ciudad de México, modalidad Cartel "*La expresión de AKNA está disminuida en cáncer de orofaringe positivo a VPH*" y en el XI Congreso Nacional de Virología, realizado en la ciudad de Guanajuato celebrado en el mes de septiembre de 2019, modalidad Cartel "*The Human Papillomavirus regulates AKNA levels through p53 and its expression is altered in oropharyngeal cancer*". Las constancias pertinentes se presentan en el anexo 2.

Agradecimientos

Al Dr. Joaquín Manzo Merino por brindarme la oportunidad y apoyo para realizar este proyecto. Por compartir su conocimiento, pasión y consejos, los cuales me motivaron a terminar este proyecto y me mostraron la posibilidad de emprender otros.

Al Dr. Leonardo Josué Castro Muñoz por sus valiosas aportaciones y enseñanzas para poder realizar este proyecto.

Al Biólogo Diego Reyes y la QFB. Adriana Morán por su ayuda en la extracción y tipificación de VPH en los casos de CaOF.

Al patólogo Dr. Roberto Herrera Goepfert por brindarme los bloques para realizar este proyecto, así como su ayuda en el análisis semicuantitativo del grado de expresión de AKNA.

A la Dra. Guillermina Baay, del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” por su apoyo en la digitalización de los casos de CaOF.

Al Dr. Roberto Jiménez y la QFB. Mashenka Robles, del Instituto Nacional de Cancerología por su ayuda en el análisis estadístico.

Al histotecnólogo José de Jesús Marín Aquino, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por brindarme los cortes de tejido control necesarios para la estandarización del anticuerpo en este proyecto.

A mi casa de estudios, la UNAM, por abrirme las puertas a un mundo de gran conocimiento el cual, me dio los medios para poder desarrollarme tanto académicamente como de manera personal.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias: Elena, Ramiro, Abril, Octavio, Brenda, Margarita, Noé, entre muchos otros, que dejaron una huella importante en esta maravillosa etapa e hicieron este camino más formidable.

Dedicatorias

A mi mamá:

Mamá, eres mi guerrera imparable, mi pilar, mi ser lleno de luz y amor, gracias por creer en mí incluso cuando yo no lo hago, por apoyarme en cada paso que he dado y por no dejarme caer, por el esfuerzo que haces día a día para sacarnos a delante y principalmente gracias por no rendirte. Eres mi razón principal para seguir adelante.

A mis hermanos:

Josué, desde niña he tratado de seguir tus pasos para ser un poco de lo listo e increíble que eres, gracias por tu apoyo y amor incondicional. Ángel, eres mi corazón y mi mayor motivación para seguir a delante, gracias por tus risas, travesuras y amor.

A mis abuelos:

Abuelis, eres mi segunda mamá, gracias por ser mi cómplice, por las risas, por tus consejos, por tu comida y amor. Abuelito, siempre has sido como un papá para mí, gracias por tus regaños y amor. Ambos me motivan a seguir creciendo en todos los ámbitos. Gracias por todos los valores que inculcaron en mí.

A mis amigos:

A Dani, Mashe, Adri, Dieguits, Jos (mi sensei) y Katy, por extenderme una mano cuando más lo he necesitado, por llenar este camino con risas, consejos, compañerismo y cariño, por motivarme a alcanzar este y muchos otros logros, son un ejemplo a seguir para mí.

Al Dr. Joaquín Manzo Merino:

Gracias por ayudarme a crecer en el ámbito académico y personal, por tus consejos y risas, por tu amistad, por cada voto de confianza que has puesto en mí, por ayudarme a ver que, aunque las cosas se pongan difíciles, debemos seguir echándole ganas. Gracias por dejarme pertenecer a tu grupo, el cual se convirtió en una segunda familia para mí.

ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	1
II. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	2
III. RESUMEN.....	3
IV. INTRODUCCIÓN	
IV.I. Cáncer de Orofaringe	
IV.I.I. Generalidades del cáncer.....	5
IV.I.II. Cáncer de orofaringe.....	5
IV.I.III. Epidemiología.....	7
IV.I.III.I. Epidemiología en México.....	7
IV.I.IV. Factores de riesgo.....	8
IV.I.V. Factores pronóstico.....	9
IV.I.VI. Tratamiento.....	10
IV.II. Virus del Papiloma humano (VPH)	
IV.II.I. Generalidades del VPH.....	10
IV.II.II. Carcinogénesis inducida por el VPH.....	14
IV.II.III. Prevención de la infección por el VPH.....	15
IV.III. Respuesta inmune ante la infección del VPH	
IV.III.I. Respuesta inmune innata.....	16
IV.III.II. Respuesta inmune adaptativa.....	19
IV.III.III. Moléculas Coestimuladoras y activación de linfocitos.....	20
IV.III.IV. Mecanismo de evasión de la respuesta inmune por el VPH.....	21
V. ANTECEDENTES	
V. I. Inhibición de moléculas coestimuladoras en cáncer y por el VPH.....	25
V. II. Factor transcripcional AKNA.....	25
V.III. ¿Cómo la oncoproteína E6 afecta a AKNA?.....	27
V.IV. Polimorfismo de AKNA y asociación con cáncer.....	27
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28

VIII. JUSTIFICACIÓN.....	28
IX. HIPÓTESIS.....	29
X. OBJETIVOS	
X.I. General.....	29
X.II. Particulares.....	29
XI. DISEÑO DE ESTUDIO.....	29
XII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
XIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
XIV. RESULTADOS.....	36
XV. DISCUSIÓN.....	46
XVI. CONCLUSIONES.....	50
XVII. PERSPECTIVAS.....	51
XVIII. BIBLIOGRAFÍA.....	51
XIX. ANEXOS.....	59

I. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
Ab	Anticuerpo del inglés <i>Antibody</i>
APC	Células presentadoras de antígeno del inglés <i>Antigen-presenting cells</i>
CaOF	Cáncer de Orofaringe
CD	Células dendríticas
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
CTL	Linfocitos T citotóxicos del inglés <i>Cytolytic T Lymphocyte</i>
DAB	3,3' diaminobencidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HRP	Peroxidasa de rábano del inglés <i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
ISRE	Elemento de respuesta específico de interferón del inglés <i>Interferon specific response element</i>
LC	Células de Langerhans del inglés <i>Langerhans cells</i>
Min	Minutos
mL	Mililitros
OPSCC	Carcinoma de células escamosas orofaríngeas del inglés <i>Oropharyngeal squamous cell carcinoma</i>
PAMP	Patrones asociados a patógenos
PBS	Buffer Salino de Fosfatos del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RRP	Receptores de reconocimiento de patógenos
SG	Supervivencia Global
T°	Temperatura
TLRs	Receptores tipo Toll del inglés <i>Toll like receptors</i>
VPH	Virus del Papiloma humano

II. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

- Figura 1.** Estructuras que comprenden la orofaringe.
- Figura 2.** Tipos de VPH presentes en cáncer de orofaringe.
- Figura 3.** Número estimado de casos emergentes a nivel mundial de CaOF.
- Figura 4.** Número estimado de casos incidentes en México de CaOF.
- Figura 5.** Tasas de incidencia de CaOF.
- Figura 6.** Estructura del virión del VPH.
- Figura 7.** Regiones del genoma del VPH.
- Figura 8.** Ciclo infeccioso del VPH en epitelio plano estratificado.
- Figura 9.** Expresión de AKNA en tejido linfático de amígdala y bazo sano.
- Figura 10.** Expresión de AKNA en epitelio plano estratificado de amígdala.
- Figura 11.** Casos negativos a AKNA.
- Figura 12.** Expresión de AKNA en casos de CaOF.
- Figura 13.** Estimación por el método de Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio.
- Figura 14.** Estimación por el método Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio categorizada de acuerdo con los niveles de expresión de AKNA.
- Figura 15.** Estimación por el método Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio categorizada de acuerdo con la presencia de VPH.

Tablas

- Tabla 1.** Funciones de las proteínas que son codificadas en la región temprana (E: Early) del genoma viral.
- Tabla 2.** Funciones de células del sistema inmune.
- Tabla 3.** Impacto de oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16/18 en algunas vías de señalización del sistema inmune innato.
- Tabla 4.** Criterios de selección de pacientes.
- Tabla 5.** Protocolo de amplificación para GAPDH.
- Tabla 6.** Condiciones de Reacción para la PCR multiplex.
- Tabla 7.** Ciclos térmicos utilizados en la PCR multiplex.
- Tabla 8.** Características generales de la población de estudio.
- Tabla 9.** Resultados del análisis de expresión de AKNA.
- Tabla 10.** Resultados de la detección y tipificación de VPH.

III. RESUMEN

El Virus del Papiloma humano (VPH) es el agente causal de la infección de transmisión sexual más común en el mundo y es responsable del 5% de todos los casos de cáncer a nivel mundial. Alrededor del 70% de las infecciones por VPH se resuelven espontáneamente en 1 año y del resto de estos casos, un 90% se resuelve en dos años. Aquellos casos en los cuales se presenta una persistencia por parte del VPH son debido a una falla en la respuesta del sistema inmune, incrementando el riesgo a la progresión hacia cáncer o bien afectando el comportamiento clínico de la enfermedad.

El óptimo funcionamiento del sistema depende de la acción de diversos factores, dentro de estos la proteína AKNA es un factor de transcripción que pertenece a una familia de factores que conducen a vías inflamatorias, lo cual interviene en el proceso de transformación celular. AKNA contiene un dominio de unión al DNA en su dominio AT-hook, el cual se une a regiones ricas en AT en los promotores de CD40 y CD40L, activando su expresión y por tanto promueve la diferenciación de las células B. Esta acción, impacta en el reconocimiento y eliminación de células ya sea infectadas por algún patógeno o bien células transformadas.

Un estudio reciente comprobó que AKNA es un blanco de degradación de la oncoproteína E6 del VPH, lo cual tiene como consecuencia una desregulación en los niveles de CD40. Hecho que pudiera favorecer que no haya una adecuada respuesta inmune, llevando así a una persistencia por parte del virus lo que puede conducir a desarrollar cáncer. Por último, se ha visto que AKNA está asociado a un pronóstico favorable en algunos tipos de cáncer, como en cáncer de cérvix y en cánceres de cabeza y cuello, sin embargo, no se ha descrito el efecto que la presencia del VPH podría ejercer en este fenómeno, específicamente en el cáncer de orofaringe.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la asociación entre la presencia de VPH y los niveles de expresión de AKNA con el desenlace clínico de pacientes con CaOF para lo cual se realizó un estudio retrospectivo en casos de cáncer de orofaringe a los cuales se les evaluó los

niveles de expresión de AKNA a través de inmunohistoquímica; con PCR se detectó la presencia de VPH en las muestras y por último se realizó un análisis de asociación.

Se encontró que la prevalencia general del VPH en la población incluida fue de 30.23%, donde la mitad de estos casos (16.2%) fueron positivos a VPH de bajo riesgo; así mismo se determinó que AKNA presenta una localización mayoritariamente en citoplasma, hecho que podría influir en su función como factor transcripcional. Al hacer el análisis estadístico, notamos que no hay relación entre la positividad a VPH y los niveles de expresión de AKNA. En cuanto a la supervivencia global, no se encontró una relación estadísticamente significativa con la presencia del VPH, aunque se aprecia que hay una tendencia a que los pacientes positivos al virus tienen una mayor supervivencia global.

Al analizar la asociación de los niveles de AKNA en el núcleo con la supervivencia global, se encontró que aquellos casos con AKNA nuclear presentan un tiempo de supervivencia reducido siendo esta estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que podría haber una proteína que esté traslocando a AKNA al citoplasma, impidiendo así su función adecuada. Se esperaba que los pacientes positivos a AKNA tuvieran un mayor tiempo de supervivencia global debido a que AKNA está asociado con la activación de la respuesta inmune; sin embargo, no fue así, siendo probable que existan otros factores (como el consumo de alcohol y tabaco) que estén afectando en el desenlace clínico.

Aunque este estudio nos dio un acercamiento sobre la influencia de AKNA en el comportamiento de la población con CaOF, aún se requieren diversos estudios más detallados que indaguen en los procesos que AKNA podría estar regulando y que en consecuencia promuevan un peor pronóstico en CaOF.

IV. INTRODUCCIÓN

IV.I. Cáncer de Orofaringe

IV.I.I. Generalidades del Cáncer

El cáncer ocupa la segunda causa de muerte en el mundo (Ferlay et al. 2010), el cual se puede definir como una condición clínica que se manifiesta por la presencia de uno o varios tipos de crecimientos neoplásicos, es decir, incluye todo tipo de crecimientos anormales (Weinberg, 2014). Se produce cuando las células normales sufren una transformación adquiriendo así, ciertas características conocidas como “hallmarks” las cuales son: Mantenimiento de las señales de proliferación, insensibilidad de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inducción de la angiogénesis e invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg 2011). Estas características son el resultado de la interacción entre factores genéticos del paciente y tres agentes causales: 1) físicos, 2) químicos y 3) biológicos; dentro de este último que incluye tanto bacterias como virus, se estima que causan alrededor de un 18% de los casos de cáncer a nivel mundial. Dentro de los virus oncogénicos se pueden encontrar: Virus de la Hepatitis B, Polyomavirus, Adenovirus y el Virus del Papiloma humano (VPH) (Schiller and Lowy 2014), siendo este último causante del 5% de todos los casos de cáncer a nivel mundial (de Martel et al. 2017).

IV.I.II. Cáncer de Orofaringe

Dentro de los cánceres causados por el VPH se encuentra el cáncer de orofaringe (CaOF). La orofaringe es un órgano ubicado en la parte superior de las vías aerodigestivas (compartimento central de la faringe), es decir comprende las amígdalas, base de la lengua, paladar blando, paredes laterales y posteriores de la garganta, úvula y anillo Waldeyer (*Figura 1*). Se sabe que más del 90% de los casos de cánceres de orofaringe corresponde a carcinoma de células escamosas, los cuales se originan en el revestimiento interno de la boca y garganta (D’Souza et al. 2007).

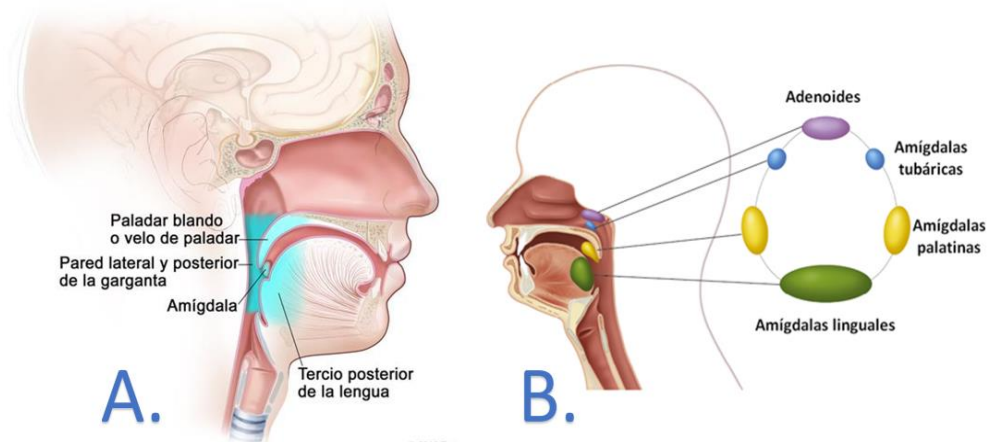


Figura 1. Estructuras que comprenden la orofaringe. A. En azul se muestra los órganos que conforman la orofaringe. B. Conjunto de estructuras que forman el anillo de Waldeyer. Obtenido de: Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de EUA.

Varios mecanismos se han reportado en la génesis de los tumores que se originan en el tracto aerodigestivo superior, siendo los más destacados los efectos cancerígenos del alcohol y el tabaco ya que desempeñan un papel importante en su etiopatogenia debido a su potencial para inducir mutaciones en el gen supresor tumoral p53. Sin embargo, el papel del VPH se ha reconocido ahora como un factor independiente en el desarrollo de estas neoplasias. Durante los últimos 15 años se ha observado un aumento en la incidencia de carcinoma de células escamosas inducida por VPH mostrando una frecuencia creciente en pacientes jóvenes y en aquellos no fumadores o bebedores, especialmente asociada con tipos de VPH de alto riesgo como el tipo viral 16 (Villagomez-Ortiz et al. 2016) cuya presencia en este tipo de cáncer oscila del 86 al 95%.

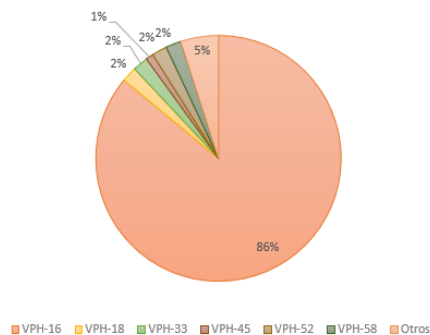


Figura 2. Tipos de VPH presentes en cáncer de orofaringe. Modificado de Guo, 2016.

IV.I.III. Epidemiología

De acuerdo a Globocan, el número de casos estimados de cáncer de orofaringe a nivel mundial en el 2020 fue de 98 412 (GLOBOCAN, 2020). El VPH globalmente es responsable del cáncer de cabeza y cuello en un 89.7%, particularmente los tipos 16 y 18 son causantes del 84.9%; se ha visto que predomina en América del Norte y Europa del Norte (de Martel et al. 2017). De manera global, el CaOF ha incrementado su incidencia especialmente en hombres y se estima que el número de casos aumentará dramáticamente en el 2040, representando 142,797 nuevos casos (Figura 3).

Número estimado de casos incidentes de 2018 a 2040, cáncer de orofaringe, todas las edades, a nivel mundial

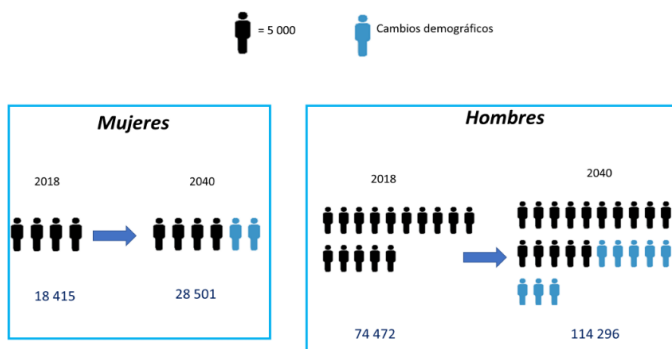


Figura 3. Número estimado de casos emergentes a nivel mundial de CaOF. El número de casos incidentes en mujeres es poco en comparación con el número de casos de los varones lo cual indica que debemos implementar un mayor cuidado en prevenir de igual manera el contagio de VPH en la población masculina al promover la vacunación en esta población. Obtenido y modificado de: Globocan, 2018.

IV.I.III.I. Epidemiología en México

En México, se presentan menos de 500 casos de CaOF cada año, con una tasa de mortalidad de 0.3%, mayoritariamente se presenta en edades entre 50 y 70 años, es decir en México este tipo de cáncer representa menos del 10% de los carcinomas de células escamosas del tracto aerodigestivo superior (Granados-García 2016). De manera importante, se estima que los casos de CaOF aumentarán casi un 100% para el año 2040, de acuerdo con las proyecciones de Globocan alcanzado cerca de 922 casos anuales (Figura 4).

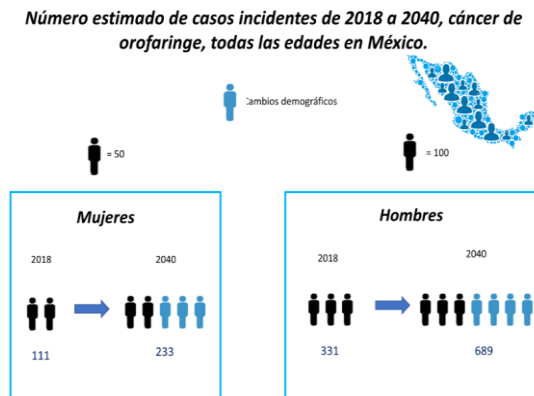


Figura 4. Número estimado de casos incidentes a en México de CaOF. Obtenido y modificado de Globocan 2018.

IV.I.IV. Factores de riesgo

En la actualidad, el cáncer de cabeza y cuello se puede dividir en dos categorías de acuerdo con el agente etiológico: 1) Positivos al VPH, cuyos factores de riesgo están relacionados con el comportamiento sexual activo (especialmente el número de parejas sexuales orales a lo largo de la vida) y 2) Negativos al VPH, los cuales se relacionan fuertemente con el consumo de alcohol y tabaco. Adicionalmente se ha visto que los pacientes VPH positivos tienen una mayor supervivencia (Chaturvedi et al. 2011; Taberna et al. 2017).

Según datos del repositorio de tejidos del programa *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) de los Estados Unidos, la prevalencia de cáncer negativo para el VPH disminuyó un 50% de 1988 a 2004 y la prevalencia de los cánceres orofaríngeos positivos para VPH aumentó en 225% (Figura 5) (Chaturvedi et al. 2011).

El carcinoma de células escamosas orofaríngeas (OPSCC) ha mostrado un aumento gradual en el predominio masculino desde la década de 1970, a pesar de las reducciones en el tabaquismo, hecho que se ha asociado al aumento en los casos positivos a VPH. Como resultado de la incidencia creciente de OPSCC asociado a VPH, el OPSCC VPH+ es ahora una entidad bien definida con características bien conocidas que incluyen la edad joven, el sexo masculino, no fumar y el comportamiento sexual activo (Nakashima et al. 2014). Recientes

estimaciones mundiales atribuyen entre un 18-28% al VPH, sin embargo, esto varía dependiendo la región geográfica estudiada (Morbini et al. 2019).

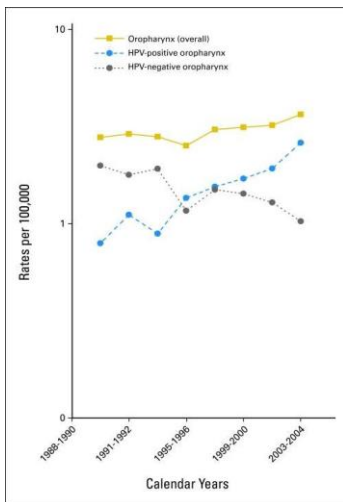


Figura 5. Tasas de incidencia de CaOF. Se puede observar que la incidencia, particularmente la que es positiva a VPH va en aumento, mientras que la negativa al este virus va en decremento. Se observa un punto de transición epidemiológica donde los casos positivos al VPH representan ahora la entidad más común en este tipo de cáncer. Tomado de Chaturvedi, 2011.

De manera alarmante, el OPSCC en la actualidad ha mostrado ser la entidad más asociada a VPH en el mundo y en algunos países como EUA ha superado en números al cáncer de cérvix (Van Dyne et al. 2018).

IV.I.V. Factores pronóstico

La presencia de metástasis, aumento del número y tamaño en los ganglios linfáticos así como la invasión extracapsular y localización en niveles distales, antecedentes de fumador y estadio clínico se asocian con un aumento en el riesgo de recaída así como una menor supervivencia en cáncer de cabeza y cuello (Ang et al. 2010; Granados-García 2016). Sin embargo, la presencia del VPH ha obligado a la modificación y clasificación de estos tumores, donde desafortunadamente poco se ha estudiado al cáncer de orofaringe como una entidad única, siendo esta neoplasia la que presenta mayor presencia del VPH (de Martel et al. 2017).

Los HNSCC impulsados por el VPH muestran características biológicas y clínicas distintas, incluido un pronóstico favorable, se ha visto que este tipo de cáncer tiene menos

alteraciones somáticas y cambios en la expresión de proteínas en comparación con los cánceres negativos al virus (Ren et al. 2020).

IV.I.VI. Tratamiento

Los pacientes con CaOF reciben cirugía, radiación y quimioterapia como tratamiento primario; sin embargo, a pesar de esto se tiene una alta tasa de mortalidad. La tasa de supervivencia a 5 años es del 50% y se ha mantenido así durante las últimas décadas (Dasari and Tchounwou 2014).

En tumores tempranos, el control se hace mediante radioterapia o cirugía, los tumores moderadamente avanzados o resecables, se tratan con cirugía y tratamiento adyuvante que incluye quimioterapia y radioterapia; en los tumores muy avanzados o no resecables, se puede lograr una paliación prolongada con quimioterapia basada en cisplatino y radioterapia concurrente (Granados-García 2016).

En el tratamiento adyuvante, incluso con la resección completa, un 10% de los pacientes recaen con metástasis a distancia y un 60% desarrollan recidiva locorregional, por tanto, la quimioterapia posoperatoria con cisplatino y radioterapia concurrente se recomienda para pacientes con alto riesgo de recaída (Granados-García 2016).

Actualmente, se ha postulado una disminución en la fracción de radiación en los casos positivos al VPH encontrando que esta reducción logrará desaparecer el tumor en el mismo tiempo y sin complicaciones para los pacientes, por lo que resulta importante estudiar las posibles alteraciones que ejerce el VPH en este tipo de cáncer (Fung et al. 2017).

IV.II. Virus del Papiloma humano (VPH)

IV.II.I. Generalidades del VPH

El VPH es un virus pequeño de un diámetro entre 52-55 nm que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, posee un genoma de DNA de doble cadena desnudo circular de 8Kb que

se encuentra dentro de una cápside viral icosaédrica formada por 72 capsómeros. Cada uno de los cuales está formado por 5 moléculas de la proteína L1 y en el centro de estos pentámeros se localiza una molécula de la proteína L2, la cual no está totalmente expuesta en la superficie del virión, sólo su extremo amino terminal (*Figura 6*) (López *et al.*, 2006; Manzo *et al.* 2014).

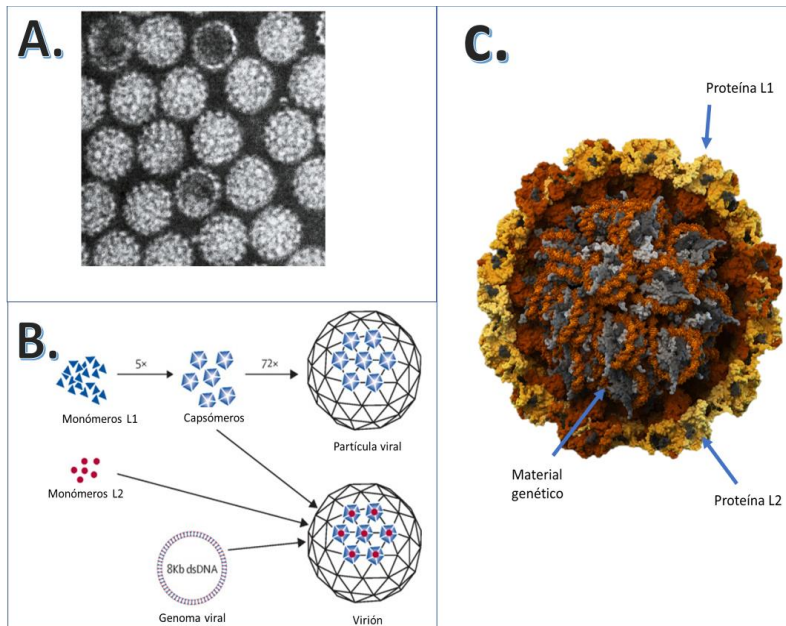


Figura 6. Estructura del virión del VPH. A) Micrografía electrónica de transmisión muestra viriones de VPH. B) Los monómeros de L1 forman capsómeros y en su centro se encuentra la proteína L2 y en conjunto forman la cápside viral, la cual contiene al genoma viral. C) Corte transversal de la estructura tridimensional de VPH.

Con fines de estudio, el genoma del VPH ha sido dividido en 3 regiones: 1) Región no codificante larga de control (LCR), la cual contiene el origen de replicación así como secuencias que regulan expresión del genoma viral; 2) una región temprana (E: Early) que contiene secuencias que codifican para proteínas que controlan la replicación y mantenimiento del genoma viral (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) cuyas funciones se resumen en la tabla 1; y 3) una región tardía (L:Late) que codifica las proteínas de la cápside L1 y L2 que forman la estructura del virión y facilitan el empaquetamiento y la maduración del virión (*Figura 7*) (Z. Chen, de Freitas, and Burk 2015).

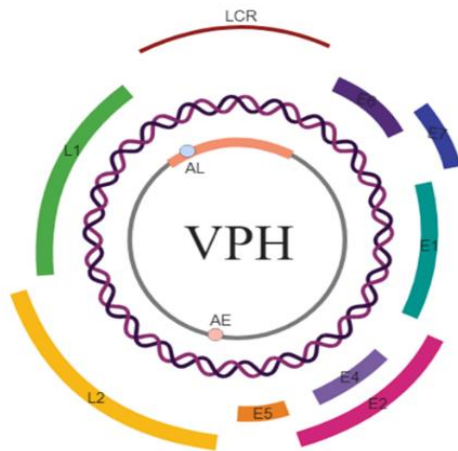


Figura 7. Regiones del genoma del VPH. Región temprana (E), Región tardía (L), Región larga de control (LCR). Modificado de Satanley, 2012.

A la fecha, se han secuenciado los genomas de aproximadamente 200 tipos de VPH los cuales se agrupan en 16 géneros; sin embargo, 5 son los más destacados: Alfa, Beta Gamma, Nu y Mu (Cubie 2013). Los VPH causan una amplia gama de enfermedades, desde lesiones benignas hasta tumores invasivos (Bzhalava, Eklund, and Dillner 2015). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó 12 tipos de VPH como carcinogénicos y los denominó VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59), siendo el VPH16 el más prevalente (Bzhalava et al. 2013).

Tabla 1. Funciones de las proteínas que son codificadas en la región temprana (E: Early) del genoma viral.

Proteína	Función
E1	Modulador de la replicación de DNA, se une al origen de replicación. Helicasa ATPasa dependiente.
E2	Se une al DNA en secuencias específicas alrededor del origen de replicación viral y recluta a E1 para promover replicación. Regulación de la transcripción de los genes de E6 y E7.
E4	Causa la disrupción de la citoqueratina en células escamosas, lo cual se asocia con la liberación de viriones y la formación de coilocitos.
E5	Transformación celular mediante la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento e inhibición del sistema inmune.
E6	Tiene diversos blancos de degradación, uno de estos es p53 lo cual puede promover la transformación celular.
E7	Degrada a pRB ocasionando la liberación de E2F para así promover la entrada de las células infectadas a fase S y provoca que haya replicación celular.

Modificado de De la Fuente-Villareal *et al.*, 2014.

El VPH infecta exclusivamente los queratinocitos en la capa basal de la epidermis y del epitelio de la mucosa a través de micro-heridas y abrasiones que otorgan acceso a las mismas (Wenbo Ma, Melief, and van der Burg 2017). Para que el virus pueda ingresar, se activa un mecanismo de endocitosis mediado por la proteína L2 que a su vez requiere de clatrin y heparán sulfato (glicoproteína que se encuentra en la membrana de las células basales). Una vez endocitado, se promueve la liberación del genoma viral el cual es transportado al núcleo donde se mantiene en forma episomal (Manzo et al. 2014).

Posterior al ingreso del genoma viral, el promotor temprano de la transcripción se activa en células basales y se mantiene en un bajo número de copias (50-100 aprox.), mientras que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 es reprimida por la proteína viral E2. Conforme los queratinocitos se van diferenciando, migran hacia la superficie del epitelio y por tanto dejan de dividirse, es cuando el promotor dependiente de diferenciación se activa y conduce a un aumento en la expresión de E6 y E7 promoviendo así la síntesis de DNA celular e inhibiendo apoptosis. Como consecuencia se generan miles de copias del genoma viral, desencadenando expresión de genes L1 y L2 para el ensamblaje de los viriones en la capa superficial (*Figura 8*) (Stanley 2012).

Como consecuencia de una infección por VPH, las células de la capa basal comienzan a proliferar sin control permitiendo la aparición de lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) (Woodman, Collins, and Young 2007).

Este agente biológico es causante de varios tipos de cáncer, dentro de los que se encuentran cáncer cervicouterino, ano, vulva, pene, vagina y de manera importante el de orofaringe (Bzhalava, Eklund, and Dillner 2015).

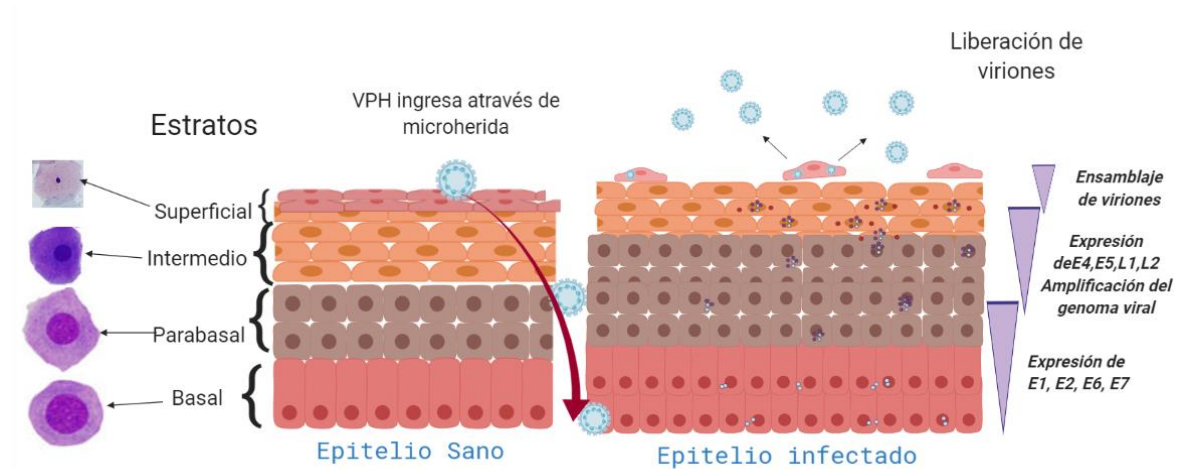


Figura 8. Ciclo infeccioso del VPH en epitelio plano estratificado. El epitelio plano estratificado se puede dividir en 4 capas: basal, parabasal, intermedio y superficial. Conforme se diferencian, migran hacia la zona superficial donde en determinado momento se descaman. El virus ingresa por una micro-herida a la capa basal, en donde E1 y E2 regulan la replicación del genoma viral, conforme se van diferenciando las células se expresa E6 y E7 para promover el crecimiento y división celular para que así se siga replicando el genoma viral; esta maduración celular es modulada por E5. Posteriormente en la zona superficial, L1 y L2 se expresan y promueven el ensamblaje de las partículas virales, las cuales son liberadas gracias a la acción de la proteína viral E4 que promueve la disrupción de los filamentos de citoqueratina. Modificado de Manzo et *al.*, 2014

IV.II.II. Carcinogénesis inducida por el VPH

La actividad transformante de las oncoproteínas E6 y E7 está mediada principalmente por interacciones proteína-proteína que conducen a un entorno capaz de replicación que eventualmente conducen a cáncer (Lo Cigno et al. 2020).

Se ha demostrado que los oncogenes virales E6 y E7 inactivan dos proteínas supresoras de tumores: p53 y pRb, respectivamente. La oncoproteína E7 se une a la forma no fosforilada de la proteína Retinoblastoma (Rb), lo cual ocasiona que el ciclo celular avance. La oncoproteína E6 se une a p53, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación vía

proteasoma (Husain and Neyaz 2017; Stanley 2012). De igual manera interfiere en otras redes celulares, tales como la vía PIK3CA-AKT-mTOR.

Adicionalmente, la proteína E5 contribuye al proceso carcinogénico al promover la supervivencia de la célula tumoral (Husain and Neyaz 2017). En conjunto, da como resultado la pérdida del control del ciclo celular al haber replicación del DNA viral en células que no deberían estar en ciclo (queratinocitos diferenciados), por tanto no hay regulación del crecimiento en la célula infectada propiciando a un aumento en mutaciones e inestabilidad cromosómica conduciendo así al desarrollo de cáncer (Husain and Neyaz 2017; Stanley 2012).

En el caso particular de los cánceres de cabeza y cuello positivos a VPH se han reportado pérdidas significativas en el número de copias en 22 genes y ganancias en 65, incluidos el gen RB1 y PIK3CA (Litwin et al. 2017).

En un estudio realizado por el equipo de Parfenov, se encontró que un subconjunto sustancial de HNSCC VPH positivo demostró una expresión mínima de VPH 16 E6/E7 pero un aumento drástico en la expresión de genes E2, E4 y E5, lo cual podría indicar que hay un mecanismo alternativo de oncogénesis viral del VPH que no depende de E6 y E7 o de la integración viral. En el estudio muestra que los efectos de E2/E4/E5 sobre el crecimiento celular y el ciclo celular son dependientes de p53 (Ren et al. 2020)

IV.II.III. Prevención de la infección por VPH

La prevención primaria para evitar el desarrollo de cáncer inducido por el VPH radica en la implementación de las vacunas que previenen la infección, la prevención secundaria implica los sistemas de detección, mismos que en la mayoría de los países es rentable. Esto pone de manifiesto la factibilidad de la prevención entre un 70% y 90% para el desarrollo de cáncer causado por VPH. Sin embargo, en los países menos desarrollados esto no sucede así (de Martel et al. 2017), ya que no toda la población tiene acceso a la vacuna, aunado a que no se tiene una correcta educación sexual.

Actualmente, existen 3 tipos de vacunas dirigidas a evitar la infección por VPH: 1) Cervarix, vacuna bivalente dirigida contra los VPH tipo 16 y 18; 2) Gardasil, vacuna tetravalente dirigida contra los VPH tipo 16, 18, 6 y 11; 3) Gardasil 9, la cual está dirigida contra los VPH tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (de Martel et al. 2017).

El centro para Control de Enfermedades (CDC) recomendó en 2016 2 dosis con 6 meses de diferencia a la edad de 11 a 12 años. Para adolescentes y adultos jóvenes con una edad entre 15 y 26 años, la recomendación es de 3 dosis (Gupta, Glueck, and Patel 2017).

La neutralización de las partículas virales debido a la respuesta humoral inducida por la vacuna contra la proteína L1 del VPH es lo que hace que las vacunas profilácticas sean realmente útiles en evitar el desarrollo de los cánceres asociados a este virus (Gupta, Glueck, and Patel 2017). Por ende, la apropiada respuesta inmunológica contra el VPH es un factor fundamental en la eliminación tanto de células infectadas por VPH como de aquellas transformadas por este virus.

IV.III. Respuesta inmune ante la infección del VPH

IV.III.I. Respuesta inmune innata

A pesar de los esfuerzos por parte del VPH para evadir el sistema inmune del huésped, de un 80 a 90 % de las infecciones se resuelven con el tiempo, las verrugas y lesiones de grado 1 (CIN1) se revierten como resultado de una respuesta inmune exitosa contra las proteínas E2 y E6; cuyo reconocimiento se correlaciona con la presencia de células CD8 y CD5. Adicionalmente, las células eucariotas expresan receptores codificados por el sistema inmune innato, los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), siendo los que reconocen motivos moleculares invariantes conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Dentro de los PRR se encuentran los receptores tipo Toll (TLR); estos receptores pueden activar respuestas del sistema inmune tanto innato como adaptativo (Stanley 2012).

En particular, los queratinocitos secretan citocinas proinflamatorias, lo cual es fundamental para la activación de las células inmunes residentes en los tejidos, como son las células de Lagerhans (LC) y los macrófagos, así como para el reclutamiento de células T efectoras, que en conjunto inician una respuesta inmune adaptativa hacia la lesión o infección local. Por otro lado, los queratinocitos expresan TLR tanto en la superficie celular (TLR 1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) como en los endosomas (TLR3 y TLR9). En específico, la activación de TLR3 con RNA de doble cadena (característica de infección viral) induce la expresión de TLR7, lo cual activa los genes de respuesta de interferón (IFN), tal como el IFN de tipo I, que ocasiona respuestas citotóxicas de tipo Th1. Los IFN- α e IFN- β son de tipo I y se caracterizan por tener propiedades antivirales, antiproliferativas, antiangiogénicas e inmunoestimuladoras, actuando como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Stanley 2012).

Por otro lado, se encuentran los linfocitos T citotóxicos (CTL), lo cuales pueden destruir células infectadas por virus. Esta destrucción depende de la presentación de péptidos derivados de patógenos por moléculas MHC clase I en la superficie de los queratinocitos (Zhou, Tuong, and Frazer 2019).

Se ha visto que durante una infección por VPH hay un aumento de la infiltración de células T CD8, lo cual se relaciona con una mayor supervivencia global. Las células T CD8 interactúan con su entorno a través de múltiples citocinas, especialmente IFN- γ , IL-2, 4,8,12 Y 17; el aumento de la expresión de IL-17 en células HNSCC VPH+ se asocia con la infiltración de linfocitos th17, resultante de la diferenciación de células T CD4 (Lechien et al. 2019).

Así mismo, los sensores de patógenos innatos pueden reconocer su DNA. Hay una activación de la proteína AIM2 (Ausente en el melanoma 2), por el DNA viral que conduce a la activación de la caspasa-1 y de la intertelucina 1 β (IL-1 β). IL-1 β restringe la replicación del genoma del VPH y la transcripción de genes al mejorar la asociación de la heterocromatina con los promotores tempranos y tardíos (Westrich, Warren, and Pyeon 2017b).

En conjunto, podemos decir que una respuesta inflamatoria temprana podría ser crítica para iniciar una sólida defensa del huésped contra la infección por VPH (Westrich, Warren, and Pyeon 2017b). A continuación, se enlistan las funciones de las células inmunitarias en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Tabla 2).

Tabla 2. Funciones de células del sistema inmune. Modificado: Lechien et al. 2019.

Células	Marcador celular	Funciones teóricas	Conclusiones
Células T CD8	CD8	<ol style="list-style-type: none"> 1. Detección de células neoplásicas y efecto citotóxico a través de la unión de MHC clase I. 2. Reclutamiento de linfocitos Treg. 3. Regulación al alza de PD-L1 en células tumorales a través de un IFN-γ dependiente de conducta. 	<p>El número de células T CD8+ aumenta a lo largo de la progresión del tumor.</p> <p>La infiltración de células T CD8+ suele asociarse con una mejor respuesta del huésped al tumor.</p> <p>Una mayor infiltración de células T CD8+ se asocia con una mejor SG.</p>
Células T CD4	CD4	<p>El papel de las células T auxiliares CD4 no está claro debido a una amplia gama de subconjuntos de células CD4+.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Los linfocitos Th-1 pueden activar linfocitos citotóxicos. 2. Los linfocitos Th-2 estimulan la inmunidad humoral y activan los eosinófilos. 3. Los linfocitos Th-17 pueden tener un fenotipo Th-1 en el microambiente tumoral. 	<p>La alta infiltración de linfocitos T CD4+ se asocia con resultados controvertidos.</p> <p>Algunos autores informan que en las cohortes de pacientes VPH negativos, un nivel alto de CD4+, los TIL se asociaron con una mejor SG, siendo opuesto con los resultados para pacientes con VPH+.</p>
Regulador células T	Foxp3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mantenimiento de la tolerancia inmunológica a los tejidos del huésped. 2. Supresión de linfocitos citotóxicos y otras células. 	<p>Las Treg pueden promover la progresión del tumor.</p> <p>La participación de Tregs en HNSCC es controvertida: algunos estudios mostraron que un mayor nivel de Tregs está relacionado con un peor pronóstico. Otros informaron que los recuentos altos de Treg están asociados con un mejor pronóstico. El escape inmunológico se logra produciendo IL-10 y TGF-β y consumiendo IL-2.</p>
Células dendríticas LC y MDSC	<p>Inmaduro: CD1a</p> <p>Inmaduro S-100</p> <p>Maduro: CD83</p> <p>LC: CD207</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presentación de antígenos asociados a tumores al sistema inmunológico (MHC de clase I y II) y estimulación de la diferenciación de células T. 2. Los agentes inmunosupresores como IL-10 y TGF-β convierten las CD inmaduras en CD tolerogénicas, que inducen tolerancia de células T específicas de antígeno a través de la activación de Tregs, el silenciamiento de la tolerancia de células T específicas de 	<p>La infiltración de DC aumenta a lo largo de la progresión del tumor.</p> <p>El papel de la CL en HNSCC es controvertido: algunos estudios mostraron que la infiltración de DC disminuye en HNSCC, mientras que otros observaron que fue mayor en las áreas fibróticas submucosas orales de HNSCC.</p>

		antígeno diferenciado y la diferenciación de células T CD4+ vírgenes en Tregs.	
Macrófagos	CD68 M2: CD68/CD163	Presentación de antígenos asociados a tumores al sistema inmunológico y regulación de la inflamación. M1: activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos y diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes en células efectoras Th1 (efectos antitumorales). M2: Estimulación de la diferenciación Treg; la secreción de algunos factores (TGF- β , TNF- α , IL-10) crea un entorno favorable para el crecimiento tumoral y la inmunosupresión.	La infiltración de macrófagos aumenta a lo largo de la progresión del tumor. Densidad de microvasos intratumorales y factores angiogénicos (VEGF) se asociaron positivamente con el nivel de infiltración de macrófagos. Los macrófagos facilitan la generación de matriz tumoral y la angiogénesis a través de la eliminación de depósitos de fibrina extravasculares. También estimulan la expresión de HIF-1 α , haciendo que el tumor sea más invasivo y agresivo.
Natural killers	CD56	1. Activación de linfocitos T citotóxicos. 2. Actividad antitumoral directa.	Las células NK pueden matar directamente VPH- y VPH+ en HNSCC. El bajo número de células NK CD56+ infiltrantes de tumores se correlaciona con una disminución significativa de la SG.

IV.III.II. Respuesta inmune adaptativa

La respuesta adaptativa comprende la respuesta humoral que se basa en las células B y sus productos, así como la respuesta mediada por células basada en la activación de las células T. Se cree que una respuesta vigorosa basada en células T juega un papel importante en la progresión del OPSCC asociado al VPH. Así mismo, el microambiente del OPSCC asociado al VPH está marcado por una alta expresión de quimiocinas proinflamatorias y receptores de quimiocinas. Estos factores son importantes en el reclutamiento de TIL (linfocitos infiltrantes de tumor), especialmente células T citotóxicas CD8+, las cuales son las principales células efectoras antitumorales. Los péptidos antigénicos presentados por moléculas de MHC de clase 1 expresadas por células tumorales conducen a la activación de las células T CD8+. Las células diana de los linfocitos T CD8+ se destruyen mediante la secreción de TNF α e IFN- γ , la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas y la apoptosis inducida mediante interacciones Fas/FasL. Así mismo, se han identificado otras células inmunitarias en el microambiente tumoral del OPSCC asociado al

VPH, un ejemplo de esto son las células T auxiliares CD4+; estas interactúan con los antígenos expresados en el MHC de clase II, lo que da como resultado la secreción de citocinas y por tanto, la consiguiente prolongación y activación de las células T CD8 (Subbarayan et al. 2019).

El ciclo de vida del VPH es estrictamente intraepitelial y los viriones se producen sólo a partir de la capa superior del epitelio por tanto, no hay citólisis ni viremia inducida por virus, lo que limita la exposición del VPH a las respuestas inmunitarias sistémicas. No obstante, la tasa de regresión de las lesiones precancerosas en cérvix se correlaciona fuertemente con la presencia de células T citotóxicas positivas para granzima B intraepitelial (Westrich, Warren, and Pyeon 2017a).

IV.III.III. Moléculas Coestimuladoras y activación de linfocitos

La activación de diversas células del sistema inmune está regulada por la expresión de moléculas co-estimuladoras, las cuales son un grupo heterogéneo de moléculas de la superficie celular que pueden transducir señales a células T para modular de manera positiva (receptores co-estimuladores) o negativamente (receptores co-inhibidores) la señalización de TCR, es decir, determinan el resultado funcional de la señalización del receptor de células T. La activación productiva de las células T requiere de una primera señal proporcionada por la interacción del péptido antigénico/complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con el receptor de antígeno de células T (TCR) y una segunda co-signal independiente del antígeno, la señal “coestimuladora” (L. Chen and Flies 2013; Magee, Boenisch, and Najafian 2012; Sharpe 2009).

En algunos casos, las células T activadas regulan positivamente los ligandos, como el CD40L, que activan receptores afines en las APC (O’Neill and Cao 2019).

La molécula CD40 es una proteína transmembranal de tipo I de 45 a 50 kDa que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Esta se expresa en la superficie

de células inmunes incluyendo monocitos, macrófagos, células B, células dendríticas, células presentadoras de antígeno (APC), así como en células no inmunes como son células endoteliales y células epiteliales. Su ligando CD40L, es una proteína transmembranal tipo II que se expresa en células T activas, plaquetas y macrófagos (Chonan et al. 2015). La interacción de CD40 con CD40L induce la producción de ciertas citocinas (IL-6, IL-10, TNF α , LT- α) y quimiocinas (MCP-1) (Korniluk, Kemon, and Dymicka-Piekarska 2014). Esta interacción da como resultado la maduración y activación de las células dendríticas, produciendo citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Sin embargo, la promoción del fenotipo inflamatorio depende de la localización membranal de CD40, es necesario que CD40 esté en la membrana celular (Borcherding et al. 2010; Manzo-Merino et al. 2018).

Se ha visto que CD40-CD40L es fundamental para el desarrollo de una inmunidad protectora antitumoral (O'Neill and Cao 2019). Más aún, se ha demostrado que el regulador de CD40 como de CD40L es una proteína transcripcional denominada AKNA la cual, se une a regiones ricas en AT en la región promotora de ambos genes, activando su expresión y en consecuencia la diferenciación en células B (Molitero and Resar 2011).

IV.III.IV. Mecanismo de evasión a la respuesta inmune por el VPH

La mayor parte de la población adulta ha estado en contacto con el VPH, se considera que el 80% de los individuos habrá cursado con una infección a la edad de 50 años (Schiffman et al. 2007). De estos casos, aproximadamente el 70% se resuelven espontáneamente en un periodo de 1 año y del resto de los casos, un 90% se resuelve en dos años (Sasagawa et al. 2016). Los casos que no se resuelven presentan una persistencia por parte del VPH, esto es debido a diferentes factores entre los que destacan: 1) La integración del genoma viral en los cromosomas de las células anfitrionas, ocasionando una pérdida o interrupción de la expresión de E2 induciendo la pérdida del control de la regulación de las oncoproteínas E6 y E7, promoviendo una mayor expresión de estas proteínas (Stanley 2012; Woodman, Collins, and Young 2007); 2) Una falla en la respuesta del sistema inmune debido a la acción constante de las oncoproteínas del virus (Cubie 2013; Manzo et al. 2014). Una vez que el

VPH está integrado al DNA de las células anfitrionas, estas adquieren una mayor inestabilidad genómica y por tanto mayor probabilidad a adquirir anomalías genómicas secundarias conduciendo así, a una progresión maligna (Stanley 2012).

Pero ¿cómo es que el virus evade al sistema inmunológico para lograr establecer una infección persistente?

En primera instancia, la replicación y ensamblaje del virus ocurren en queratinocitos ya diferenciados, los cuales son células destinadas a morir debido al proceso natural de descamación, mismo que se encuentra lejos del reconocimiento y la actividad inmunológica. Es decir, no se induce un proceso de inflamación y por ende no hay liberación de citocinas proinflamatorias, las cuales son importantes para activar la migración celular de las células presentadoras de antígenos (APC) (Stanley 2012). En las infecciones persistentes, las señales inflamatorias que activarían células APC intraepiteliales tales como las LC y así reclutar células Dendríticas (DC) y macrófagos, están ausentes; lo cual se debe a una disminución en la liberación de los interferones de tipo I (citocinas proinflamatorias).

Las LC son APC especializadas, que tras el reconocimiento del antígeno, su migración a tejidos linfoides secundarios permite el cebado de células inmunes adaptativas, por lo tanto al haber una interferencia en el tráfico de estas células puede favorecer la evasión inmunológica. En los cánceres asociados a VPH se ha notado una infiltración baja de LC lo que probablemente se deba a la regulación a la baja de CCL20, una quimiocina que atrae a las LC. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 promueve la regulación negativa de CCL20, que se cree se logra a través de la capacidad de E6 y E7 para inhibir la vía de señalización NF- κ B, particularmente la inhibición de CCL20 por E6/E7 durante la infección temprana da como resultado la falta de reclutamiento de células presentadoras de antígeno (APC) en el epitelio infectado por VPH, facilitando así una infección crónica (Subbarayan et al. 2019; Zhou, Tuong, and Frazer 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que este tipo de tumores que se asocian a VPH como los HNSCC tienen una expresión reducida de E-cadherina, la cual es una molécula adhesiva que permite que las LC permanezcan en la epidermis para así permitir la captación del antígeno viral (Zhou, Tuong, and Frazer 2019).

La mayoría de los virus de DNA, entre ellos el VPH, poseen mecanismos para inhibir síntesis y señalización de interferón. Particularmente las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo, interactúan con la vía de señalización del interferón. Por otro lado, E7 inhibe la transducción de señales mediada por IFN- α al unirse a P48/IRF-9, evitando su translocación al núcleo y por tanto inhibiendo la formación del complejo de transcripción ISGF-3, el cual se une al elemento de respuesta específico de interferón (ISRE) (Stanley 2012).

Por otro lado, E6 se une al factor de respuesta a interferon 3 (IRF-3) inhibiendo su función transcripcional, evitando la transcripción del RNA de IFN- α . Otra forma en que lo hace es al unirse a TYK2, evitando la unión a la porción citoplásmica del receptor de IFN e inhibiendo la fosforilación de TYK2, STAT1 y STAT2, impidiendo la activación de la vía JAK-STAT, la cual es una de las más importantes en la respuesta antiviral (Stanley 2012). En la tabla 3 se enlistan algunas vías por las cuales el virus logra evadir al sistema inmune innato y así impulsar la carcinogénesis.

Tabla 3. Impacto de oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16/18 en algunas vías de señalización del sistema inmune innato.

Mecanismo u objetivo	Modelo celular	Referencia
Vía de señalización cGAS /STING / TBK1		
E7 VPH 18 se une y antagoniza a STING	Células HeLa y fibroblastos de embrión de ratón transducidos de forma estable con retrovirus que expresan E6 o E7 de VPH18.	(Lau et al. 2015)
Silenciamiento epigenético de los genes cGAS y STING a través de la inducción mediada por E7 de VPH 16 y 18 de la metiltransferasa SUV39H1.	Células HeLa, CaSki, NIKSmcHPV18 y HEK 293 que expresan VPH 16 o VPH 18 E6 y E7.	(Albertini et al. 2018; Lo Cigno et al. 2020)
E7- VPH16 secuestra NLRX1 para inducir la degradación de STING a través de un mecanismo dependiente de la autofagia.	Líneas celulares derivadas de HNSCC que expresan ectópicamente VPH16-E7 y un modelo signénico C57 / BL /6 de VPH+ HNSCC.	(Luo et al. 2020)

Las lisinas desmetilasas H3K4 KDM5B y KDM5C suprimen epigenéticamente los niveles de expresión de ARNm de STING.	Células de cáncer de mama, VPH+ cabeza y cuello y carcinomas de cuello uterino.	(Wu et al. 2018)
Activación transcripcional del gen IFN β alterada tras la estimulación con agonistas de STING.	Líneas celulares derivadas de VPH16+ HNSCC.	(Shaikh et al. 2019)
Vía de señalización RIG-I /MAVS/ TBK1		
VPH E6 forma un complejo ternario E6-TRIM25-USP15 que reduce la estabilidad de la proteína TRIM25, lo que conduce a una ubiquitinación reducida de RIG-I y la supresión de su capacidad para interactuar con MAVS.	HEK 293T y la línea celular C33a derivada de carcinoma cervical que expresa ectópicamente E6 etiquetado con FLAG de VPH16.	(Chiang et al. 2018)
VPH E6/E7 induce la regulación a la baja de la expresión de SUV39H1, que promueve el silenciamiento epigenético de RIG-I.	Células HeLa, CasKi, NIKSmcHPV18 y HEK 293 que expresan VPH16/18 E6 o E7.	(Albertini et al. 2018; Lo Cigno et al. 2020)
Vía de señalización TLR		
VPH16 E6/E7 induce la regulación a la baja de la expresión de TLR9 tanto a nivel de ARNm como de proteína.	Queratinocitos primarios humanos transducidos de forma estable con retrovirus que expresan VPH16E6 /E7, HeLa, SiHa y CaSki.	(Hasan et al. 2007)
VPH 16 suprime la expresión de TLR en la mucosa cervical, contribuyendo a la persistencia viral.	Muestra de citocepillo cervical.	(Daud et al. 2011; Halec et al. 2018; Scott et al. 2015)
Factores de transcripción relacionados con PRR		
VPH E6 se une a IRF3 y altera su actividad transcripcional.	Proteína sintetizada <i>in vitro</i> y células transfectadas con VPH16 E6, incluidos los queratinocitos humanos primarios.	(Ronco et al. 1998)
VPH16 E7 se une a IRF1 y altera su unión al ADN y su actividad transcripcional.	Células transfectadas con VPH16 E7 y VPH16 E7 sintetizadas <i>in vitro</i> .	(Park et al. 2000; Perea, Massimi, and Banks 2000; Um et al. 2002)

Modificado de: Lo Cigno et al, 2020.

Así mismo, el VPH modula la expresión génica del huésped desregulando la metilación del DNA del huésped, la modificación de histonas y factores de transcripción. Se ha visto que la oncoproteína E7 del VPH interactúa con la DNA metiltransferasa DNMT1 y estimula su actividad, lo cual explica parcialmente los cambios globales en el metiloma del huésped que se ha observado en los queratinocitos positivos al VPH (Westrich, Warren, and Pyeon 2017b)

V. ANTECEDENTES

V.I. Inhibición de moléculas coestimuladoras en cáncer por el VPH

La desregulación de la respuesta inmune es requisito para el establecimiento de cualquier tipo de cáncer. Específicamente en aquellas neoplasias provocadas por el VPH, se ha reportado que la región FRA94 del cromosoma 9q32 es susceptible a adquirir mutaciones que pueden llevar al desarrollo de neoplasias. En esta región se encuentra el gen que codifica para la proteína AKNA (Martinez-Nava et al. 2015). Específicamente en la isoforma F1 del gen que codifica para la proteína AKNA, sufre un polimorfismo de un solo nucleótido en su dominio AT-Hook, la cual posee actividad biológica relevante en la maduración de linfocitos B. Este polimorfismo afecta la expresión de AKNA induciendo bajos niveles de la proteína, lo cual se ha asociado con la ausencia de la respuesta inflamatoria (Manzo-Merino et al. 2018; Martinez-Nava et al. 2015). Esto favorecería la persistencia del virus y por tanto significaría un mayor riesgo de desarrollar cáncer asociado a la infección por VPH.

Por otro lado, en un estudio reciente se comprobó que el factor transcripcional AKNA es un blanco de degradación de la oncoproteína E6, lo cual tiene como consecuencia una desregulación en los niveles de CD40. Este evento podría favorecer una falla en el sistema inmune del hospedero permitiendo el establecimiento de la persistencia viral, evento clave en el desarrollo de los cánceres producidos por VPH (Manzo-Merino et al. 2018).

Lo anterior supone que el VPH no solo promueve la transformación celular, sino que también podría estar modulando la respuesta inmune contra las células transformadas y en consecuencia afectar el pronóstico de los cánceres positivos al mismo.

V.II. Factor transcripcional AKNA

El gen *akna* en humanos tiene 61 kb de largo, contiene 24 exones y codifica 9 transcritos diferentes debido al resultado del uso alternativo del promotor, el empalme y dos sitios de poliadenilación. La isoforma F1 fue una de las primeras en ser descritas y es una de las pocas

probadas funcionalmente. Se ubica dentro de la región FRA94 del cromosoma 9q32, el cual es un sitio propenso a sufrir mutaciones de pérdida de función que se asocian con enfermedades inflamatorias y neoplásicas. Adicionalmente, los polimorfismos de un solo nucleótido en su motivo AT-hook se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical (Martínez-Nava et al. 2015; Moliterno and Resar 2011).

La proteína AKNA es un factor transcripcional que pertenece a la familia de proteínas del grupo A de alta movilidad (HMGA1), estas se encargan de remodelar la cromatina al orquestar los complejos transcripcionales y por tanto promover la expresión génica. Adicionalmente, se ha visto que los factores de transcripción pertenecientes a esta familia conducen a vías inflamatorias lo cual promueve la eliminación de patógenos y en casos en los que existe una desregulación continua conlleva a la transformación celular (Moliterno and Resar 2011).

AKNA juega un papel importante en la mediación de respuesta celular por inflamación, misma que fue descubierta en tejido linfoide, con alta expresión en linfocitos B y T, células Natural killer y células dendríticas. Aunque no ha sido muy estudiada, se sabe que contiene un dominio de unión al DNA en su dominio AT-hook (Wenbin Ma et al. 2011). El AT-hook es un péptido corto, repetido 3 veces en la familia de proteínas HMGA1, este dominio posee la característica de unirse al surco menor del DNA alterando su arquitectura, por lo que facilita la unión de otras proteínas en el surco mayor opuesto (Filarsky et al. 2015).

Se ha demostrado la habilidad del dominio AT-hook de la isoforma F1 para unirse a las regiones ricas en AT en los promotores tanto de CD40 como de CD40 ligando, activando así su expresión. Esta es una de las razones por las que se considera que AKNA tiene un papel fundamental en la respuesta inmune, ya que los linfocitos B dentro de los centros germinales están destinados a morir a menos que sean seleccionados positivamente por antígenos y señales iniciadas por las interacciones de las moléculas co-estimuladoras como CD40/CD40L (Martínez-Nava et al. 2015).

V.III. ¿Cómo la oncoproteína E6 afecta a AKNA?

Es bien sabido que E6 tiene una alta capacidad para inducir la degradación de diversos blancos celulares. En un estudio realizado por Manzo-Merino y colaboradores, se identificó al factor transcripcional AKNA isoforma F1 como un nuevo objetivo de degradación de la oncoproteína E6, involucrando el sistema de proteosoma. En el mismo estudio se observó que la capacidad de interacción de E6 con AKNA, es compartida con p53, ya que cuando se inmunoprecipita p53, AKNA se encuentra como parte del complejo indicando una potencial acción de este complejo ternario en la regulación de genes del sistema inmune (Manzo-Merino et al. 2018).

V.IV. Polimorfismo de AKNA y su asociación con cáncer

Es bien conocido que los factores genéticos pueden afectar la infección por VPH y modular el proceso de transformación, es así que la variabilidad genética tanto de los factores del virus como del huésped están involucrados en la susceptibilidad y/o resistencia. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) es el tipo más común de variación genética. De acuerdo con el *National Cancer Institute*, se puede definir como una variación de la secuencia de DNA que ocurre cuando un solo nucleótido en la secuencia del genoma se altera y esta alteración está presente en al menos el 1% de la población.

Como se mencionó anteriormente, la región 9q32 es susceptible a adquirir mutaciones que pueden conllevar a desarrollar cáncer, dentro de la cual se encuentra *akna*. Este gen codifica a un factor transcripcional involucrado en la maduración de linfocitos y la regulación de las señales de las moléculas CD40/CD40L. Se han realizado análisis de SNPs para todo el gen de *akna*, los cuales revelaron que hay 313 SNPs pero sólo 11 de estos son codificantes. Uno de estos SNPs parece ser relevante para la funcionalidad de la proteína, ya que afecta la capacidad de unirse al DNA. Aunque aún no es del todo claro, es particularmente biológicamente importante debido a que el gen Q1119 (el cual es una importante variante del gen *akna*) está localizado dentro del locus con mayor susceptibilidad a sufrir mutaciones y producir cáncer cervical (Perales et al. 2010).

A la fecha, se ha postulado que los niveles de AKNA son importantes en la modulación de la respuesta inmune en cáncer de cérvix, sin embargo, aún no se ha establecido si existe una asociación de los niveles de AKNA en cáncer de orofaringe, sobre todo en aquellos casos positivos al VPH. Por tanto, es de nuestro interés evaluar la asociación entre los niveles de AKNA, la presencia del VPH y el desenlace clínico en pacientes con cáncer de orofaringe.

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una asociación entre el estatus de expresión de AKNA y la positividad al VPH con el desenlace clínico de pacientes con cáncer de orofaringe?

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia del VPH ha aumentado considerablemente en los últimos años; así mismo los datos epidemiológicos apuntan a un incremento en los casos de CaOF positivos al VPH sobre todo en individuos jóvenes a pesar de existir una vacuna contra el virus.

Actualmente, los tratamientos contra el cáncer requieren de un estudio molecular detallado para poder predecir la respuesta a tratamiento y estos son escasos en CaOF, por lo que establecer una relación directa entre el VPH y la proteína AKNA podría beneficiar a la población de estudio en términos de pronóstico de la enfermedad.

VIII. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han establecido al VPH como agente causal del cáncer de orofaringe y su presencia afecta el desenlace clínico. Sin embargo, los estudios se han enfocado en el conjunto de cánceres de cabeza y cuello sin considerar que el cáncer de orofaringe presenta una mayor asociación con VPH. Por lo que conocer la prevalencia del VPH, la población a la que más afecta, el estatus de expresión de AKNA y su asociación en el desenlace clínico en

CaOF, ayudará a establecer el estatus de expresión de AKNA y positividad al virus como factor pronóstico de la enfermedad en el futuro.

IX. HIPÓTESIS

La expresión alta de AKNA en casos de cáncer de orofaringe negativos al VPH está asociada con una mayor supervivencia global, por lo que podría emplearse como un factor pronóstico en este tipo de cáncer.

X. OBJETIVOS

X.I General

Evaluar la asociación entre la presencia de VPH y los niveles de expresión de AKNA con el desenlace clínico de pacientes con CaOF.

X.II Específicos

1. Generar una base de datos clínico-patológicos de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología con diagnóstico de CaOF del año 2005-2015.
2. Detectar la presencia de secuencias de VPH en muestras de pacientes con CaOF.
3. Determinar el tipo viral presente en las muestras de pacientes con CaOF.
4. Evaluar el grado de expresión AKNA en los casos de CaOF mediante inmunohistoquímica.
5. Determinar la relación entre VPH y AKNA con la supervivencia global.

XI. DISEÑO DE ESTUDIO

Tipo de estudio: Retrospectivo.

Universo del estudio: Pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología.

Tamaño de la muestra: 151 pacientes.

Diseño estadístico: Estudio no paramétrico.

Los criterios empleados en la inclusión, exclusión y eliminación de casos fueron considerados de acuerdo con lo estipulado en la tabla 4.

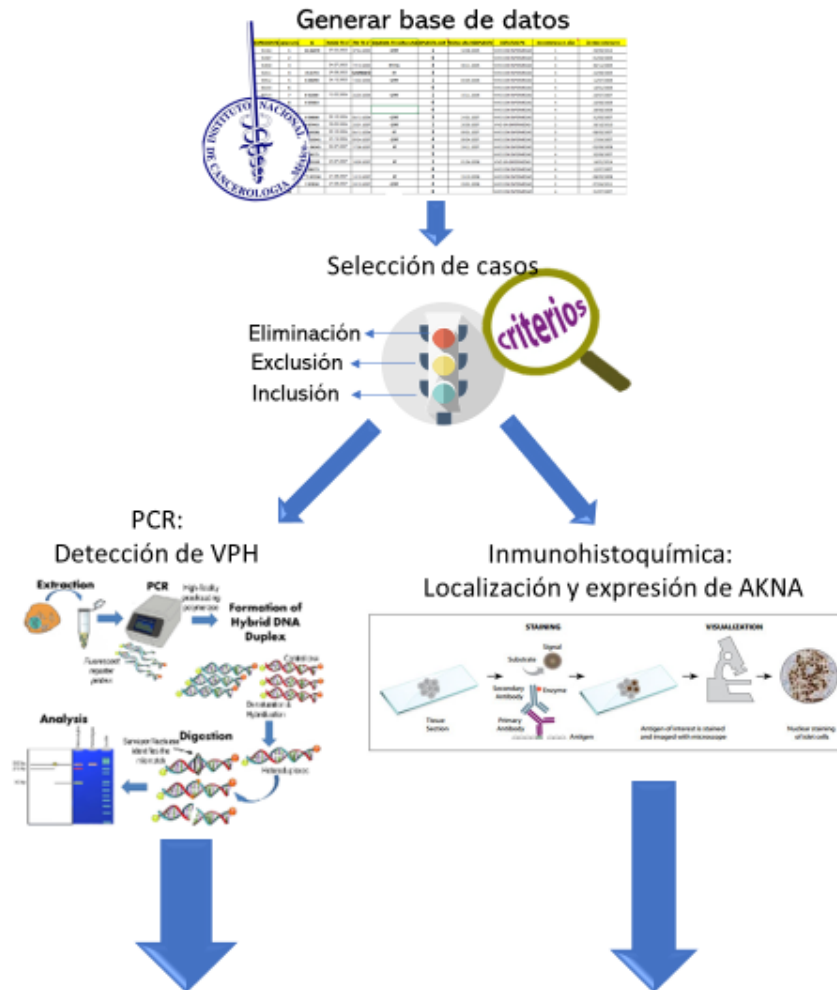
Tabla 4. Criterios de selección de pacientes.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pacientes con CaOF diagnosticado histológicamente y que al momento de toma de biopsia sean vírgenes al tratamiento. 2. Pacientes que completen un tratamiento básico. 3. Tratamiento haya sido administrado con fines curativos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Información incompleta de los parámetros. 2. Ausencia de bloque de parafina. 3. Pacientes que no terminaron tratamiento básico. 4. Datos incompletos de seguimiento 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Muestras con material o calidad insuficiente. 2. Muestras con tejido necrótico. 3. Muestras con inmunohistoquímica inadecuada.

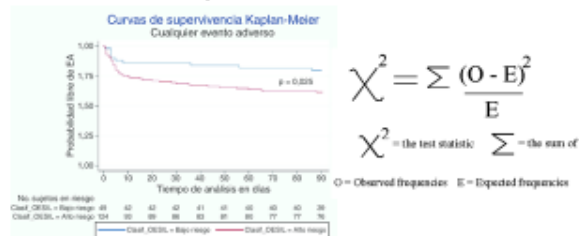
XII. DISEÑO METODOLÓGICO

A partir del registro electrónico se seleccionaron los casos para ser analizados mediante IHQ o bien PCR. Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS utilizando medidas de tendencia central.

Esquema general del diseño metodológico



Asociación de la expresión de AKNA y presencia de VPH con SG



XIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Base de datos

Mediante el uso del sistema de registro electrónico del INCan, se generó una base de datos con los siguientes parámetros: edad, tipo histológico, fecha de Dx, Tx, género, antecedentes de alcoholismo y fumador, tipo de respuesta, fecha de respuesta, fecha de muerte o de último contacto y presencia de comorbilidades.

Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizó la técnica de IHQ utilizando diferentes concentraciones del anticuerpo (Ab) primario anti-AKNA (1:25, 1:50, 1:100) en tejido linfoide como control de expresión. Se incluyó un control negativo sin anticuerpo primario y como control positivo se consideró la tinción de los linfocitos.

Detección y grado de expresión de AKNA mediante inmunohistoquímica en casos de CaOF

A partir de las biopsias embebidas en parafina de los casos seleccionados, se realizaron cortes histológicos de 2µm de espesor y se colocaron en laminillas electrocargadas. Las laminillas fueron sometidas a un proceso de desparafinización y rehidratadas con xilol y etanol. Posteriormente se colocaron en a solución de citratos *ImmunoRetriever (Bio SB)* por 12 minutos. Así mismo, se utilizaron soluciones bloqueadoras para sitios inespecíficos; la solución *quenching peroxidase soln* se incubó por 40 min y la solución bloqueadora de BSA al 10% por 30 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X para después añadir el anticuerpo primario; para el anticuerpo anti-PCNA se dejó incubando toda la noche mientras que para el anticuerpo anti-AKNA se dejó incubando 2 horas. Luego del tiempo de incubación se realizó un lavado con PBS y se agregó el anticuerpo secundario durante 30 min. Posteriormente se repitió el lavado con PBS y se adicionó el DAB (3,3' diaminobencidina), para anti-PCNA se incubó por 10 minutos mientras que para anti-AKNA se incubó 5 minutos. Para detener la reacción se colocaron las laminillas en PBS durante 5 min. Posteriormente se realizó una contratinción empleando hematoxilina, para ambos

anticuerpos se dejó por 35 segundos; transcurrido este tiempo se colocaron las laminillas en agua corriente. Por último, se lavaron con PBS 1X y agua destilada para después realizar el montaje de las laminillas.

Las laminillas se visualizaron a través del microscopio óptico y la expresión se clasificó como nula, baja, media o alta. Como control positivo se realizó la técnica tanto con anti-AKNA, como con anti-PCNA en cortes de amígdala sana y como control negativo de técnica se procesaron muestras sin el anticuerpo primario.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa SPSS (ver 24). La supervivencia se analizó mediante el estimador no paramétrico Kaplan Meyer y se compararon los grupos mediante la prueba de Log Rank, para evaluar si existía diferencia entre los grupos.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de las muestras embebidas en parafina se empleó el Kit *DNeasy Blood Extraction DNA kit* (Promega) cuyo protocolo se describe a continuación:

Partiendo de las biopsias seleccionadas, se realizaron cortes histológicos de 7 μ m y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL. En este tubo se agregaron 1200 μ L de xileno y se agitó fuertemente en vórtex, después fueron incubadas durante 10 min en un termoblock a 65°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a T° ambiente y se eliminó el sobrenadante mediante pipeteo (sin desprender sedimento). Posteriormente se añadieron 500 μ L de etanol puro al sedimento para así remover el xileno residual y se agitó fuertemente con vórtex para después centrifugar por 5 min a máxima velocidad a T° ambiente, seguidamente se removió el etanol por pipeteo de manera cuidadosa para no desprender sedimento. Posteriormente, el tubo con el tejido desparafinado se incubó con la tapa abierta durante 15 min a 37°C para permitir la evaporación del etanol. Pasado este tiempo se resuspendió en 200 μ L de buffer ATL y a su

vez se agregaron 20µL de proteinasa K, se agitó con vórtex e incubó a 55°C en el termoblock hasta que tejido quedó completamente lisado (toda la noche). Al día siguiente se agitaron las muestras con vórtex luego se añadieron 200 µL de buffer AL, se volvió a agitar con vórtex y se puso a incubar a 70°C durante 10 min. Después de este tiempo se adicionaron 200 µL de etanol y se agitó con vórtex para después agregar esta mezcla a una columna de sílica y luego centrifugar a 10000 rpm por 3 min. La columna se colocó en un nuevo tubo para después agregarle 500 µL de buffer AW1 y centrifugar a 10000 rpm durante 3 min. La columna se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µL de buffer AW2, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 200 µL de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna, se incubó a T° ambiente durante 5 min y después de centrifugó por 5 min a 10000 rpm. Por último, se añadieron 200 µL de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna, se incubó a T° ambiente durante 5 min y se centrifugó por 5 min a 10000 rpm obteniendo así el DNA puro.

La cantidad de DNA obtenida se cuantificó mediante el uso de nanodrop modelo 20000 (*ThermoFisher Scientific*). Este DNA se empleó para la detección de VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Detección de VPH

La integridad del DNA obtenido se evaluó mediante la amplificación de un fragmento del gen *GAPDH* co los primers GAPDHf 5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTA-3' y GAPDhr 5'-GACCACCTGGTCCTCAGTGT-3'. Las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR se muestran en la tabla 4.

Tabla 5. Protocolo de amplificación para GAPDH.

Blanco	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos
GAPDH	94°C 50 seg	55°C 50 seg	72 °C 30 seg	45

Tipificación

Se realizó mediante una PCR multiplex, utilizando el kit “MPCR Kit for Human Papilloma Virus Set 2 of Maxim Biotech, Inc”, el cual está diseñado para amplificar el gen E6 de los tipos de VPH 6, 11, 18, 31, 33, 52 y 58. La mezcla de reacción de PCR multiplex se realizó de la acuerdo a lo señalado en la tabla 5.

Tabla 6. Condiciones de Reacción para la PCR multiplex.

Reactivo	Volumen
Buffer Mixture 2x	12.5 µl
Oligonucleotidos 10x	2.5 µl
Taq Polimerasa (5 U/ µl)	0.5 µl
Agua	4.5 µl
DNA	5 µl
Volumen Final	25 µl

*Los volúmenes de DNA y agua variaron según la concentración de DNA de cada muestra analizada.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se sometió a los ciclos térmicos indicados en la tabla 6.

Tabla 7. Ciclos térmicos utilizados en la PCR multiplex.

Grados °C	Tiempo (min)	Ciclos
96 °C	1	2
68 °C	4	2
94 °C	1	35
68 °C	2	35
70 °C	10	1

*Termociclador- Applied Biosystem.

Electroforesis y visualización de productos

Los productos de la PCR multiplex, fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1) al 12% en un sistema de electroforesis vertical a 80 Volts, durante 90 min con buffer de corrida TBE (Tris-HCl 88mL, ácido bórico

mM, EDTA 2mM) 1x. Para la visualización de los geles se utilizó la tinción con bromuro de etidio (10mg/mL-Biorad), los geles se visualizaron en el transiluminador con luz UV con una longitud de onda de 254 nm y las imágenes fueron captadas por un fotodocumentador.

XIV. RESULTADOS

XIII. I. Población de estudio

Se analizaron un total de 151 expedientes de pacientes diagnosticados con Cáncer de orofaringe tratados en el INCan en el periodo de 1995 al 2015, para los cuales se realizó una revisión minuciosa con el fin de verificar si cumplían los parámetros de inclusión. De estos, 20 fueron excluidos por no tener datos completos, 57 por falta de bloque de parafina; 7 pacientes fueron eliminados ya que la muestra que se procesó no contenía tejido tumoral, 8 por diagnóstico diferente a CaOF, 1 caso por tejido insuficiente para realizar el análisis, 10 pacientes (muestras) no tuvieron una inmunohistoquímica adecuada y en 5 muestras no hubo suficiente material para realizar extracción de DNA. Por tanto, en el estudio se incluyeron 43 pacientes.

XIII.I.I. Características de la población incluida en el estudio

De acuerdo con el historial clínico de los 43 pacientes, la mediana de edad de la población fue de 61 años, el 87 % de la población de estudio pertenece al género masculino indicando la alta prevalencia de este tipo de cáncer en varones. Al analizar el nivel de estudios de la cohorte se detectó que el 45% de ellos solo tuvieron acceso a educación básica, incluso dentro de los cuales se reportó que no sabían leer o escribir o con primaria trunca. Un 29% de los pacientes afirmaron tener comorbilidades tales como sobrepeso, obesidad, DM y DM+HTA. Respecto al consumo de alcohol y tabaco, se encontró que el 77% afirmaron haber tenido contacto con ambos agentes. En cuanto al estadio clínico en su mayoría fueron diagnosticados en estadio avanzado y respecto al tratamiento primario que recibieron, el 52% de la población recibió QT+RT (*Tabla 7*).

Tabla 8. Características generales de la población de estudio.

<i>Característica</i>	<i>N=43</i>	<i>(%)</i>
Género		
Femenino	4	9.3
Masculino	39	90.7
Escolaridad		
Básica	21	48.9
Superior	17	39.5
Sin dato	5	11.6
Cormobilidad		
Sí	14	32.6
No	29	67.4
Antecedentes tabaco		
Sí	35	81.4
No	8	18.6
Antecedentes alcohol		
Sí	34	79.1
No	9	20.93
Tratamiento primario		
Cirugía	4	9.3
QT	8	18.6
RT	9	20.93
QT + RT	22	51.17
Estadio clínico		
III	6	13.9
Iva	14	32.6
IVb	15	34.9
IVc	3	6.8
No estadificable	5	11.8

XII.II. Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica en tejido sano de amígdala y bazo como control del anticuerpo

Con el fin de evaluar el grado de expresión de la proteína AKNA en pacientes con CaOF, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) utilizando un anticuerpo anti-AKNA, el cual es un anti-suero generado por la inoculación intramuscular de un plásmido que expresa la isoforma F1 de AKNA en ratones (Donado por el Dr. Vicente Madrid Marina, Instituto Nacional de Salud Pública). Como control negativo de la técnica, en cada corrida se incluyó

una laminilla con tejido sano de amígdala, en el cual no se agregó el anticuerpo primario, por lo que no se observó ninguna reacción.

Para la estandarización de la IHQ se utilizó tejido sano de amígdala y bazo ya que son tejidos reportados con alta expresión de la proteína AKNA (Siddiqi et al. 2001). Primero se realizó la IHQ con dilución de ab 1:50 y 1:100 con incubación durante toda la noche, sin embargo, el patólogo sugirió disminuir el tiempo de incubación debido a la alta reactividad observada, por lo que se redujo el tiempo de incubación del ab primario a 2 horas. El patólogo aprobó las condiciones de dilución 1:100, con tiempo de incubación de ab primario a 2 horas. La *figura 9* muestra que en efecto AKNA es abundante en esos tejidos, mismos que contienen abundantes linfocitos. La expresión de AKNA en tejido linfoide de amígdala (Figura 9A,B) y en bazo (Figura 9C,D) fueron empleados como control positivo de la técnica.

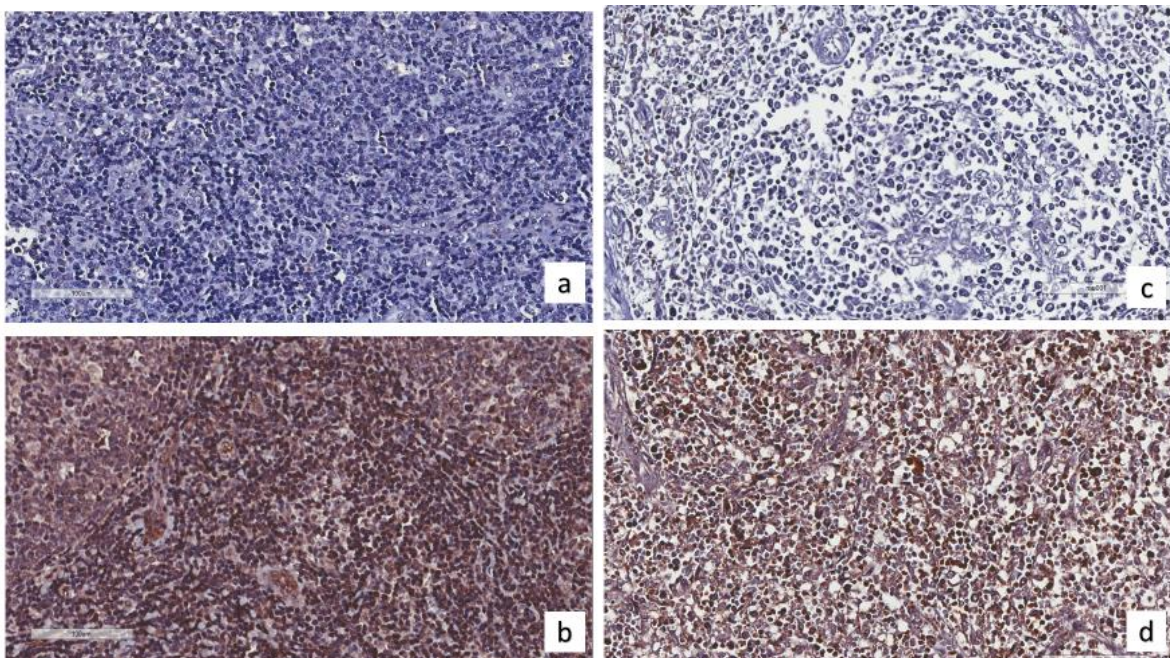


Figura 9. Expresión de AKNA en tejido linfoide de amígdala y bazo sano. a) Tejido de amígdala: control negativo de técnica. b) Tejido de amígdala: los linfocitos (tejido linfoide) muestran una expresión intensa de AKNA, mostrándose en un color café muy intenso. c) Tejido de bazo: Control negativo de técnica. d) Tejido de bazo: Hay una positividad moderada a AKNA. Aumento 40x.

Aunado a esto, se evaluó la expresión de AKNA en epitelio plano estratificado de tejido de amígdala sana (*Figura 10*), lo cual sirvió como control de expresión ya que la amígdala es una estructura dentro de la orofaringe, además de que es uno de los sitios que más desarrollan el proceso neoplásico. La expresión de AKNA se encontró en el núcleo de las células del epitelio, hallazgo que es similar al reportado en epitelio cervical (Manzo-Merino 2018).

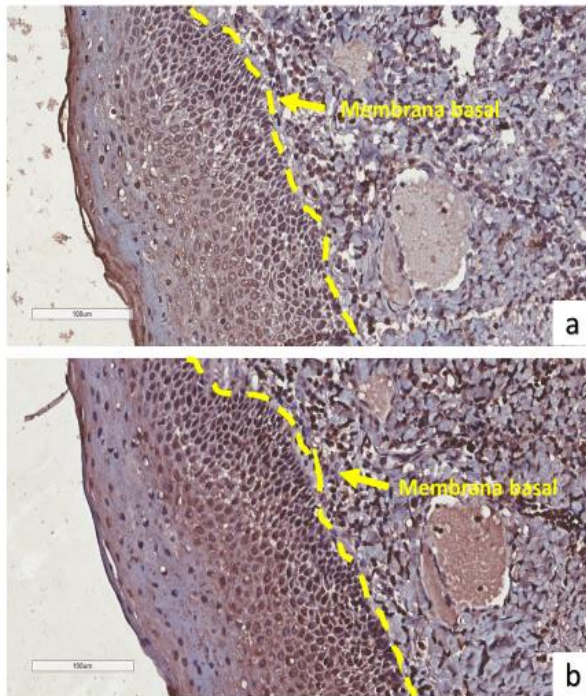


Figura 10. Expresión de AKNA en epitelio plano estratificado de amígdala. a) Dilución 1:50. b) Dilución 1:100. En ambas figuras se muestra que en las células de la capa basal la expresión en núcleo es muy intensa y conforme se diferencian los queratinocitos se observa una disminución en la intensidad de expresión. Los linfocitos, que fungieron como control positivo de técnica, se aprecian reactivos a AKNA debajo de la membrana basal. Bajo la membrana basal se observa el tejido conjuntivo en color morado. Aumento 40x.

XII.II.II. Expresión de AKNA en casos de pacientes con CaOF

Posterior a la estandarización de las condiciones, se procedió a determinar los niveles de expresión de AKNA en los casos de CaOF que cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales fueron evaluados por el patólogo.

Interesantemente, en los casos analizados se observó que el patrón de expresión de AKNA cambia de acuerdo con el grado de diferenciación del tumor. Al ser un factor transcripcional, AKNA debe encontrarse en el núcleo; sin embargo, la expresión de AKNA pasaba a ser citoplasmática conforme se diferenciaba el tumor.

El grado de expresión se clasificó en negativo, débil, moderado o intenso, así como con diferentes extensiones: focal (1 al 32% del área), parcial (33 al 66% del área) o difusa (66 al 100% del área). Dado que AKNA es una proteína nuclear, la pérdida de la localización se consideró como expresión negativa (*figura 11*). Así mismo se consideró como una tinción positiva cuando AKNA se localizó en núcleo o bien núcleo-citoplasma.

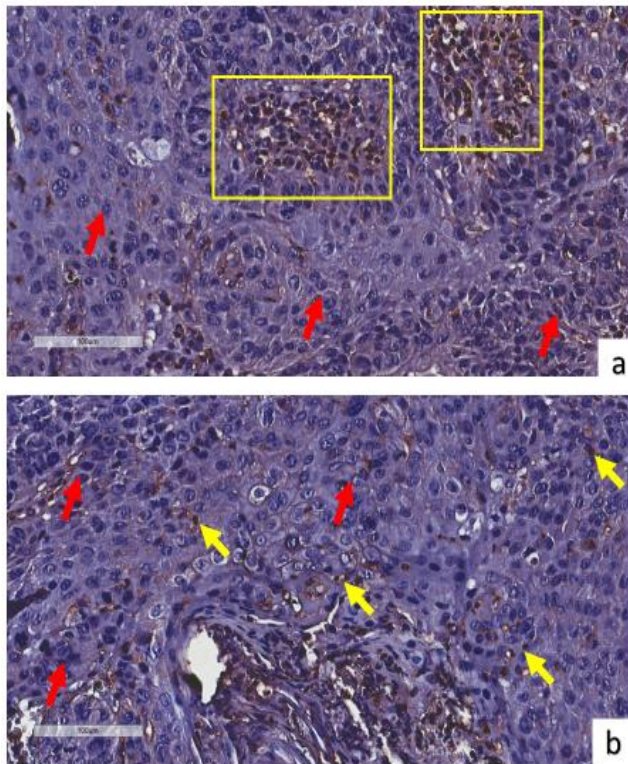


Figura 11. Casos con expresión negativa a AKNA. Imágenes representativas de la tinción negativa de AKNA mediante inmunohistoquímica. a) Las células tumorales se aprecian de un color morado (flechas rojas). En núcleo el color morado es más intenso; sin embargo, no hay coloración café lo que indica que es negativo a la proteína AKNA. En los recuadros amarillos se aprecia infiltrado linfoide, positivo a AKNA (coloración café). b) Linfocitos (flechas amarillas), se aprecian de una coloración café, debido a la positividad a AKNA. Las flechas rojas señalan células tumorales que presentan ausencia de tinción para AKNA. Aumento 40x.

Casi la mitad de la población presentó negatividad a la expresión de AKNA (53.5 %), en cuanto a los casos positivos, 6 casos (13.9%) exhibieron una expresión baja, 6 casos (13.9%) una expresión moderada y 8 casos (18.7%) una expresión intensa. Respecto a la localización celular, 2 casos (4.7%) presentaron positividad exclusiva en núcleo, 18 casos (41.9%) presentaron positividad en núcleo y citoplasma, mientras que en 20 casos (46.5%) la localización fue citoplasmática y negativa (sin alguna coloración en las células cancerosas) fueron solo 3 casos (6.9%) (tabla 8).

La figura 12 ejemplifica los diferentes grados de expresión de AKNA, tanto en núcleo como en citoplasma.

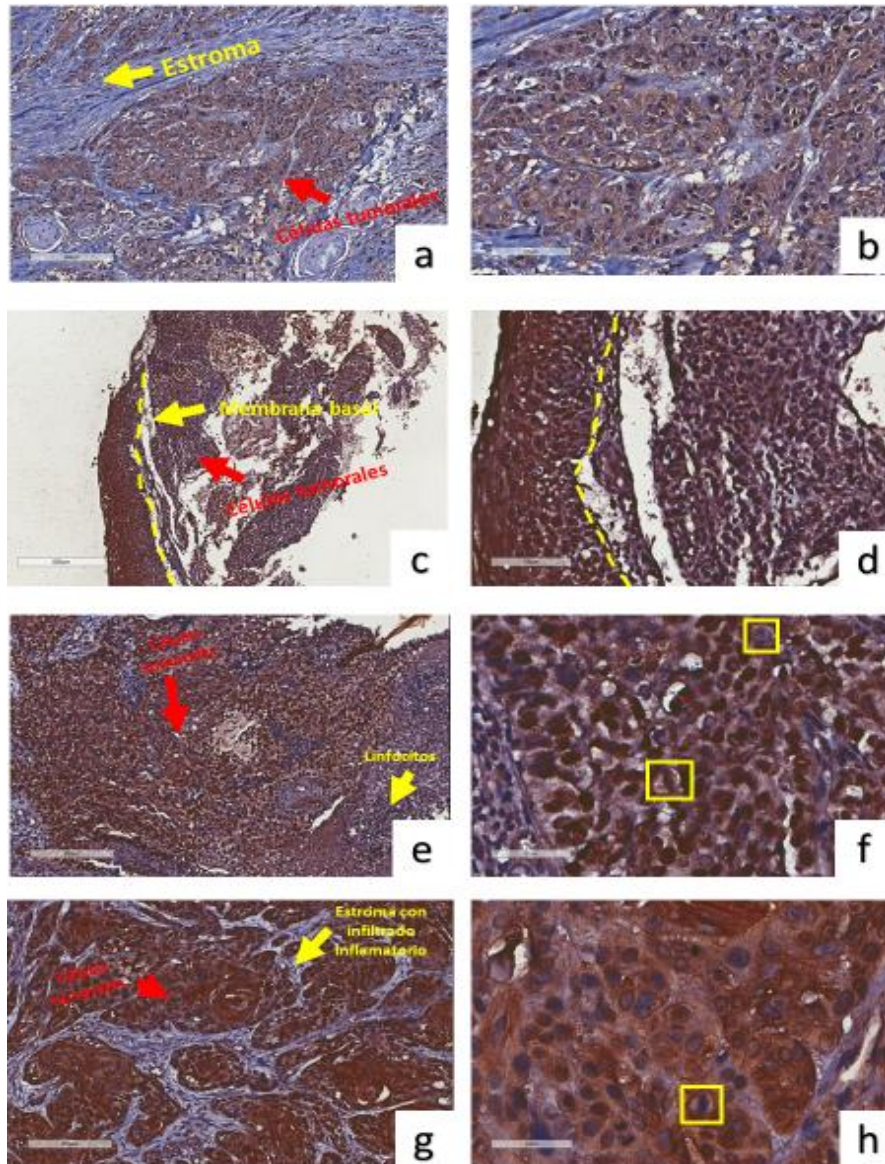


Figura 12. Expresión de AKNA en casos de CaOF. Imágenes representativas de la tinción de AKNA mediante inmunohistoquímica. a) Caso con expresión baja difusa en citoplasma; en morado se muestra el estroma. b) Amplificación de imagen en “a”: En color morado resalta el núcleo de las células, mientras que el citoplasma se muestra en un color café débil. c) Caso con expresión intermedia difusa en citoplasma. d) Amplificación de imagen en “c”: Las células tumorales se encuentran por debajo de la membrana basal, es decir, junto al epitelio normal; en esta imagen podemos apreciar que la expresión de AKNA es alta en el epitelio normal, mientras que en las células tumorales es intermedio. e) Caso con expresión intermedio difuso en citoplasma y núcleo. En color morado se muestra el estroma, el cual contiene abundante infiltrado linfoide, positivo a AKNA (coloración café). f) Amplificación de imagen en “e”: En los rectángulos amarillos se pueden apreciar células en proceso de división. g) Caso representativo con expresión alta en núcleo y mayormente en citoplasma. En color morado se muestra el estroma, el cual contiene abundante infiltrado inflamatorio, por tanto, los puntos cafés que se observan son linfocitos positivos a AKNA. h) Amplificación de imagen en “g”: En color morado se pueden apreciar algunos núcleos que son negativos a AKNA; en el rectángulo se muestra una célula en posible anafase. Del lado izquierdo aumento 20x, del lado derecho aumento 100x.

En la tabla 8 se resumen los resultados del análisis histopatológico de los casos de CaOF respecto al grado de expresión, así como su extensión. Adicionalmente se tomó en cuenta la presencia de infiltrado linfocítico, diferenciación del tumor y la presencia de coilocitos, esto último es una característica histológica clásica que indica la presencia de una infección por VPH.

Tabla 9. Resultados del análisis de expresión de AKNA.

<i>Característica</i>	<i>N=43</i>	<i>(%)</i>
<i>AKNA tinción</i>		
Positivo	20	46.5
Negativo	23	53.5
<i>Localización</i>		
Núcleo	2	4.7
Citoplasma	20	46.5
Citoplasma y núcleo	18	41.9
Negativo	3	6.9
<i>Grado de expresión en núcleo</i>		
Bajo	6	13.9
Moderado	6	13.9
Intenso	8	18.7
Negativo	23	53.5
<i>Forma de expresión en núcleo</i>		
Focal	8	18.6
Parcial	7	16.3
Difusa	5	11.6
Negativo	23	53.5
<i>Coilocitos</i>		
Sí	6	13.9
No	37	86.1
<i>Infiltrado linfocítico</i>		
Escaso	31	72.1
Leve	5	11.6
Moderado	7	16.3
<i>Grado de diferenciación del tumor</i>		
Bajo	22	51.2
Moderado	18	41.9
Bien diferenciado	3	6.9

XII.III. Detección y tipificación de VPH

De los 43 pacientes incluidos, el 30 % fueron positivos a la presencia de VPH y dentro de estos pacientes se obtuvieron subgrupos en los cuales se observó que 5 pacientes son positivos a VPH por confirmación histológica (presentan coilocitos) pero no se detectó en la PCR múltiplex, 7 pacientes fueron positivos a través de la PCR multiplex y 1 paciente fue positivo tanto en la PCR múltiplex como con confirmación histológica.

En cuanto a la distribución de los genotipos virales (*Tabla 9*), 7 pacientes presentaron VPH de bajo riesgo y 1 presentó tanto VPH de alto riesgo como de bajo.

Tabla 10. Resultados de la detección y tipificación de VPH.

<i>Característica</i>	<i>N=43</i>	<i>(%)</i>
<i>Presencia VPH</i>		
Positivo	13	30.23
Negativo	30	69.77
<i>Tipos</i>		
16,18,31,11	1	2.3
11	5	11.6
11,6	1	2.3
6	1	2.3
Sin tipificar	5	11.6
Negativo	30	69.9

XII.V. Asociación de la presencia del VPH y los niveles de expresión de AKNA con respecto a la respuesta al tratamiento.

Se realizaron estimaciones de Supervivencia Global (SG) por el método Kaplan-Meier en el programa SPSS (ver. 24). Primeramente, se estimó el tiempo de supervivencia global de la población de estudio, encontrando una mediana de 11.49 meses (figura 13).

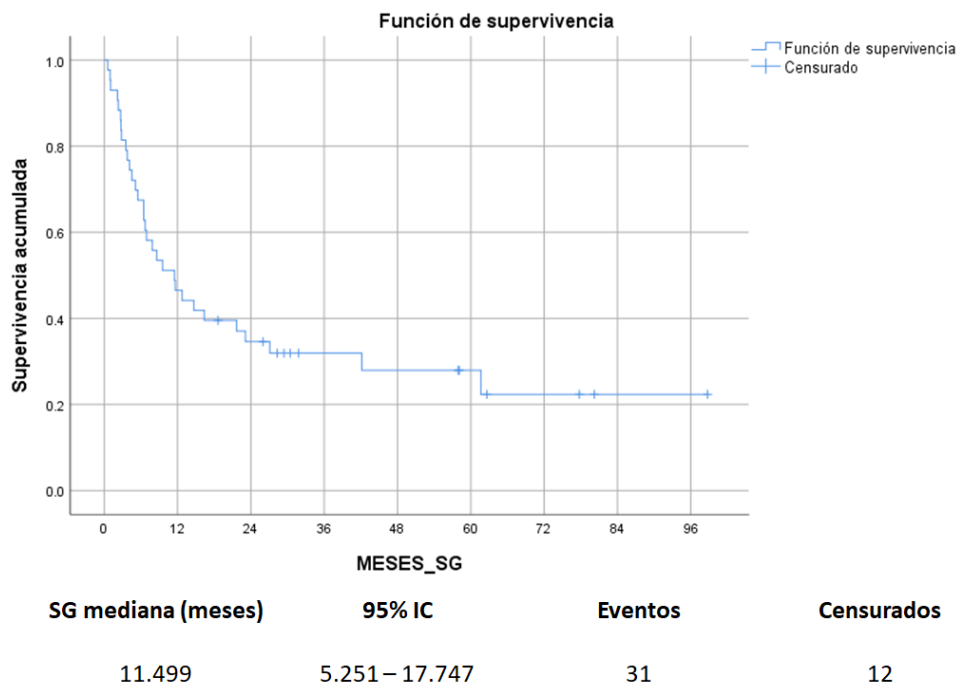


Figura 13. Estimación por el método Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio.

Posteriormente, se realizó la estimación de supervivencia global considerando los niveles de AKNA para determinar si la positividad a esta proteína tiene alguna relación con la SG, mostrando una supervivencia global de 6.70 meses en los casos positivos en comparación con los casos negativos a la proteína en donde la supervivencia global fue de 23.12 meses (figura 14), hecho que hace suponer que sí existe una relación entre la expresión de AKNA y la SG, además de que esta estimación es estadísticamente significativa, siendo que cuando los pacientes son negativos a AKNA, estos exhiben una mayor SG.

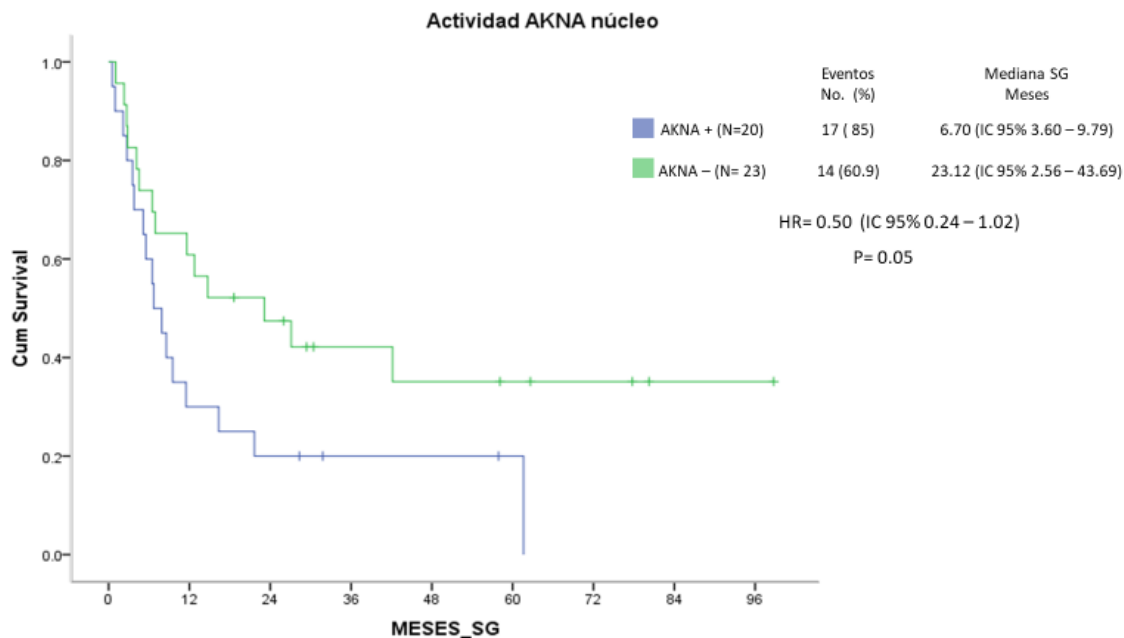


Figura 14. Estimación por el método Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio de acuerdo con los niveles de AKNA.

Adicionalmente, se realizó una tercera estimación de SG para determinar si la positividad al VPH tiene alguna relación con el tiempo de supervivencia en estos pacientes. Se observó que cuando los pacientes eran positivos a VPH tuvieron una supervivencia global de 16.36 meses, comparados con aquellos que son negativos al virus en los que la supervivencia global fue de 6.472 meses (figura 15); lo cual nos indica que sí hay una relación, pero el estadístico obtenido indicó que no es significativa.

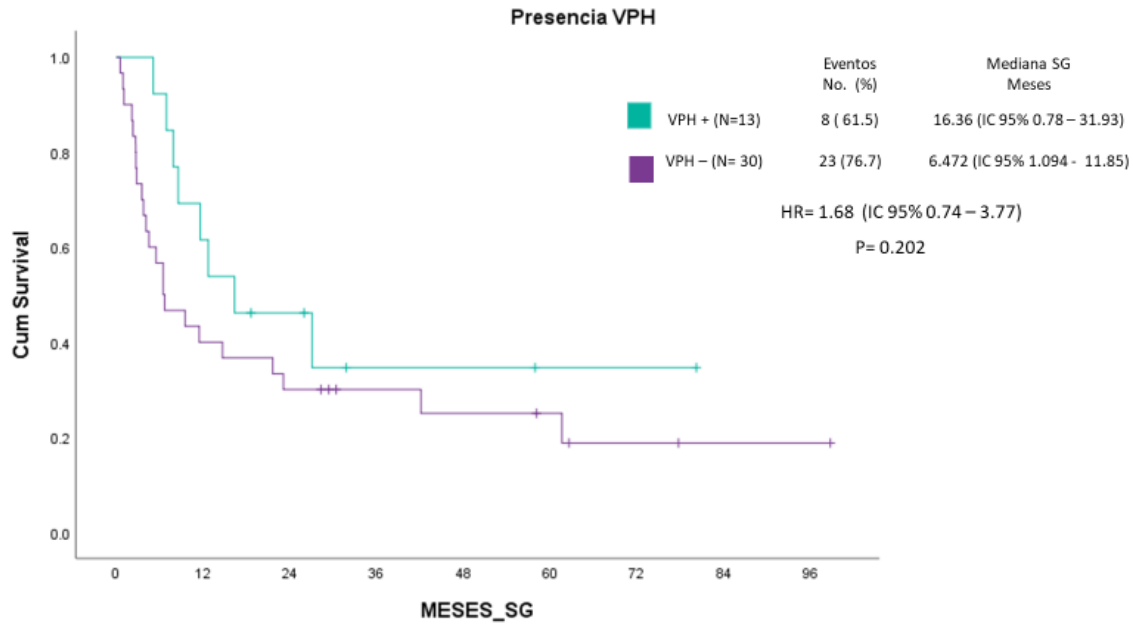


Figura 15. Estimación por el método Kaplan-Meier para supervivencia global en la población de estudio de acuerdo con la positividad al VPH.

XV. DISCUSIÓN

En la actualidad se sabe que el 30% de los casos de cáncer de orofaringe son atribuibles a la presencia del VPH, atribuible principalmente al tipo viral 16, seguido de los tipos 6, 11, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (de Martel et al. 2017). Por otro lado, se ha visto que en los pacientes negativos al VPH las lesiones son más grandes y la supervivencia global es menor en comparación con los positivos (Gunduz et al. 2020).

Este estudio se enfocó en determinar si existe una asociación entre la presencia del VPH y la positividad al factor transcripcional AKNA con el desenlace clínico de los pacientes con CaOF con el fin de determinar si hay una relación con la supervivencia global y por tanto, para determinar si AKNA podría funcionar como factor pronóstico.

A través de este estudio pudimos determinar que la mayoría de la población tuvo contacto con tabaco (81.4%) y con alcohol (79.1%), lo cual también es reportado como un factor de

riesgo para desarrollar CaOF. Por otro lado, se observó que el estadio clínico en el que llegan los pacientes, en su mayoría es avanzado, habiendo mayor predominancia en los estadios IVa (32.6%) y IVb (34.9%), lo cual nos indica que los pacientes acuden ya cuando el cáncer está muy avanzado y por tanto será más difícil que se logre una recuperación completa.

Respecto al análisis de genotipificación viral a través de la PCR multiplex, arrojó que un 30% de los pacientes fueron positivos al VPH, lo cual es similar a lo reportado a nivel mundial (de Martel et al. 2017), en donde los tipos más prevalentes fueron los tipos 11 y 6, perteneciendo ambos al grupo de bajo riesgo del VPH. Es importante mencionar que hubo un caso en específico de co-infección (4.6%), es decir, este paciente presentó genotipos virales tanto de bajo como de alto riesgo. Esto se puede saber debido a que la PCR multiplex nos permite tener más de un amplificado en la misma muestra al mismo tiempo, abarcando los grupos de bajo y alto riesgo del VPH. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que existan casos con VPH que nuestra técnica no pudo detectar, por ejemplo, aquellos casos con coilocitos pero negativos a PCR. Esto deja de manifiesto la necesidad de ahondar en las técnicas de detección del VPH.

Estudios recientes muestran que la prevalencia del VPH va en aumento en la población joven debido al uso creciente de prácticas de sexo oral (Castellsgué, 2016), sin embargo, en nuestro estudio, la mediana de edad fue de 46 años, de modo que no coincide con lo reportado en el estudio, de tal forma que se puede deber al periodo de tiempo que se tomó en cuenta para este estudio (1995-2015), siendo en su mayoría personas no jóvenes, posiblemente con otras ideologías que no ponían en práctica el sexo oral.

En un estudio realizado por Guo y colaboradores en 2016, se determinó que el VPH tipo 16 es el más asociado con el desarrollo de CaOF a nivel global (Guo, Eisele, and Fakhry 2016). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que los tipos virales más prevalentes para la población atendida en el Instituto Nacional de Cancerología fueron los tipos 11 y 6.

Respecto a la elevada tasa de población masculina que tuvimos en nuestro estudio, es posible que sea debido a que reportaron un mayor consumo de alcohol y tabaco, factores que favorecen el desarrollar cáncer de orofaringe. Esto, aunado a que son la población que no tiene conocimiento de que al igual que las mujeres, deben vacunarse para evitar una infección por VPH.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la expresión del factor de transcripción AKNA, el cual está involucrado en los procesos de la respuesta inmune como lo es la inflamación cuya alteración ha sido descrita por el VPH y sus bajos niveles se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino (Martinez-Nava et al. 2015).

La isoforma F1 de la proteína AKNA tiene un dominio N-terminal de tipo AT-hook, el cual tiene la capacidad de unirse a regiones promotoras ricas en AT de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD40L, activando así, su expresión para lograr una eficiente respuesta inmune tanto celular como humoral(Sims-Mourtada et al. 2005). Como se mencionó anteriormente, al haber una infección por el VPH la respuesta inmune se desregula y por tanto, se produce un estado antiinflamatorio(Molitero and Resar 2011), lo que nos puede llevar a pensar que el VPH puede estar desregulando de alguna manera a AKNA durante la infección o bien a lo largo del proceso carcinogénico.

En un estudio reciente, se hicieron diversos experimentos para comprobar lo anteriormente dicho y en efecto, los resultados apuntan a que AKNA es un blanco de degradación de la oncoproteína E6 del VPH que a su vez involucra el proteosoma; así mismo este estudio reveló que E6 y p53 interactúan con AKNA, formando así un trímero. Sin embargo, no se determinaron los efectos reguladores de este complejo (Manzo-Merino et al. 2018). Así mismo, se discute que la degradación de AKNA se puede deber a un efecto secundario por parte de la degradación de p53 por E6.

En este estudio no se pudo determinar si los niveles de la proteína AKNA son dependientes de la presencia de VPH, debido a que no se contó con una población mayor, por lo que no

se pudo realizar una curva de supervivencia global de estos dos factores. Es por esto que se tuvo que realizar la estimación por separado, en donde encontramos que sí hay una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$) en la supervivencia global de los pacientes de acuerdo con la positividad a AKNA (es decir, cuando AKNA está ausente, los pacientes exhiben un mayor tiempo de supervivencia). Contrariamente, no se encontró diferencia significativa cuando se trata de la positividad al VPH ($p=0.202$), lo cual no coincide con los reportado en la literatura, pero se puede deber a que el tamaño de nuestra población de estudio (n) incluida no fue muy grande, por tanto, se perdió fuerza estadística. Con estos resultados, aún no se podría proponer a AKNA como factor pronóstico.

En cáncer de cérvix, en el cual se ha evaluado la expresión de AKNA por IHQ, se ha observado que en el tejido epitelial normal hay una fuerte inmunotinción en contraste con las áreas del tumor, además se observó que en los coilocitos la tinción fue completamente negativa (Manzo-Merino et al. 2018). En el caso de este estudio, las muestras analizadas no nos brindaban área de tumor en contraste con epitelio normal, por lo que fue difícil hacer una comparación entre tejido sano y tumoral para cada paciente. El tejido tumoral tuvo diferentes grados de inmunotinción y se observó una tendencia respecto al grado de diferenciación del tumor, es decir, entre mayor diferenciación, AKNA se localizaba en el citoplasma, hecho que podría indicar su inactividad y por ende una pérdida en el reconocimiento del tumor por parte del sistema inmune. También, este hecho sugiere que alguna proteína celular podría estar translocando a AKNA fuera del núcleo para evitar una respuesta inmune en contra del tumor.

De manera interesante, los pacientes que fueron positivos a AKNA en núcleo, tuvieron una menor SG, lo cual resulta confuso, ya que se ha reportado en la literatura que los pacientes positivos a la proteína AKNA tienen una mayor supervivencia global, lo cual es lógico ya que al estar funcionando correctamente el factor de transcripción AKNA, hay una correcta respuesta inmunológica sin embargo, curiosamente en este estudio fue lo contrario, ya que la presencia de AKNA se asoció a una menor supervivencia global, pero esto se puede

asociar a diversos factores como por ejemplo que el número de casos de nuestro estudio no fue igual para aquellos negativos y positivos, otro ejemplo de algo que pudo influenciar en esto es que AKNA se presentó en una localización tanto nuclear como citoplasmática (caso que fue tomado como negativo a AKNA ya que sólo debe ser una proteína con localización nuclear). Por otra parte, AKNA ha sido postulado como un supresor tumoral en cancer gástrico, sin embargo pueden existir diferencias sustanciales en cuanto a la función de esta proteína de acuerdo con el origen celular del tumor, hecho que amerita mayores estudios (Wang et al. 2020).

Para tener un enfoque mucho más completo, se podrían hacer otros ensayos para complementar la información obtenida en este estudio, por ejemplo, evaluar la expresión de p53 y CD40 en estos mismos casos para asociar los niveles de AKNA con la presencia de otras proteínas blanco del VPH. De igual manera, se podría realizar una inmunofluorescencia, la cual permitiría evaluar al mismo tiempo la expresión de diversas proteínas como AKNA, CD40, p53 y adicionalmente una proteína que fuera otro control de inflamación; todo esto en las muestras de pacientes de CaOF. Adicionalmente, en un modelo celular se podría silenciar a p53 y determinar como se expresa AKNA y por tanto CD40, lo cual se podría hacer mediante el uso de siRNAs y posteriormente Western Blot.

XVI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de VPH en cáncer de orofaringe fue del 30.23%, donde la mayoría de estos casos (16.2%) fueron positivos a VPH de bajo riesgo (tipos 11 y 6) y un caso (2.3%) fue positivo tanto para VPH de alto y bajo riesgo.
2. AKNA presenta una localización mayoritariamente en citoplasma en casos de CaOF.
3. El VPH no está asociado con los niveles de expresión de AKNA en tejidos derivados de CaOF.
4. No hay una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de VPH y la SG en CaOF.

5. Hay una tendencia estadísticamente significativa en cuanto a la presencia de AKNA y la SG, ya que los pacientes que presentaban AKNA, tuvieron una SG de 23.12 meses en cambio los negativos vivieron 6.70 meses.

XVII. PERSPECTIVAS

1. Aumentar el tamaño de la población incluida en el estudio.
2. Realizar la secuenciación de las muestras para permitir una mejor identificación de los casos positivos a VPH.
3. Evaluar la expresión de AKNA a través de IHQ en casos de CaOF en diferentes grados de diferenciación del tumor para determinar si hay una asociación entre el grado de diferenciación y la localización de la proteína.
4. Evaluar a través de IHQ la expresión de p53 en los mismos casos para determinar si p53 está influyendo en la expresión de AKNA en presencia de la infección por VPH.

XVIII. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini, Silvia et al. 2018. "HPV18 Persistence Impairs Basal and DNA Ligand-Mediated IFN- β and IFN- λ (1) Production through Transcriptional Repression of Multiple Downstream Effectors of Pattern Recognition Receptor Signaling." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200(6): 2076–89.
- Ang, K Kian et al. 2010. "Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer." *The New England journal of medicine* 363(1): 24–35.
- Borcherding, Frauke et al. 2010. "The CD40-CD40L Pathway Contributes to the Proinflammatory Function of Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Disease." *The American Journal of Pathology* 176(4): 1816–27.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843472/>.
- Bzhalava, Davit et al. 2013. "A Systematic Review of the Prevalence of Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Types." *Virology* 445(1–2): 224–31.
- Bzhalava, Davit, Carina Eklund, and Joakim Dillner. 2015. "International Standardization

- and Classification of Human Papillomavirus Types.” *Virology* 476: 341–44.
- Chaturvedi, Anil K et al. 2011. “Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(32): 4294–4301.
- Chen, Lieping, and Dallas B Flies. 2013. “Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition.” *Nature reviews. Immunology* 13(4): 227–42.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23470321>.
- Chen, Zigui, Luciana Bueno de Freitas, and Robert D Burk. 2015. “Evolution and Classification of Oncogenic Human Papillomavirus Types and Variants Associated with Cervical Cancer.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1249: 3–26.
- Chiang, Cindy et al. 2018. “The Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Targets USP15 and TRIM25 To Suppress RIG-I-Mediated Innate Immune Signaling.” *Journal of virology* 92(6).
- Chonan, Masashi et al. 2015. “CD40/CD40L Expression Correlates with the Survival of Patients with Glioblastomas and an Augmentation in CD40 Signaling Enhances the Efficacy of Vaccinations against Glioma Models.” *Neuro-Oncology* 17(11): 1453–62.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648302/>.
- Lo Cigno, Irene, Federica Calati, Silvia Albertini, and Marisa Gariglio. 2020. “Subversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins.” *Pathogens (Basel, Switzerland)* 9(4).
- Cubie, Heather A. 2013. “Diseases Associated with Human Papillomavirus Infection.” *Virology* 445(1–2): 21–34.
- D’Souza, Gypsyamber et al. 2007. “Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer.” *The New England journal of medicine* 356(19): 1944–56.
- Dasari, Shaloam, and Paul Bernard Tchounwou. 2014. “Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action.” *European journal of pharmacology* 740: 364–78.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058905>.
- Daud, Ibrahim I et al. 2011. “Association between Toll-like Receptor Expression and Human Papillomavirus Type 16 Persistence.” *International journal of cancer* 128(4):

879–86.

- Van Dyne, Elizabeth A et al. 2018. “Trends in Human Papillomavirus–Associated Cancers — United States, 1999–2015.” *Morbidity and Mortality Weekly Report* 67(33): 918–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6107321/>.
- Ferlay, Jacques et al. 2010. “Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.” *International journal of cancer* 127(12): 2893–2917.
- Filarsky, Michael et al. 2015. “The Extended AT-Hook Is a Novel RNA Binding Motif.” *RNA biology* 12(8): 864–76.
- Fung, Nicholas, Farhoud Faraji, Hyunseok Kang, and Carole Fakhry. 2017. “The Role of Human Papillomavirus on the Prognosis and Treatment of Oropharyngeal Carcinoma.” *Cancer and Metastasis Reviews* 36(3).
- Granados-García, Martín. 2016. “Oropharyngeal Cancer: An Emergent Disease?” *Salud Pública de México; Vol. 58, Núm. 2 (2016): The burden of cancer in Mexico: facing the immediate challenges*. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7798/10666>.
- Gunduz, Mehmet et al. 2020. “Identification and Chemoresistance of Cancer Stem Cells in HPV-Negative Oropharyngeal Cancer.” *Oncology letters* 19(1): 965–71.
- Guo, Theresa, David W Eisele, and Carole Fakhry. 2016. “The Potential Impact of Prophylactic Human Papillomavirus Vaccination on Oropharyngeal Cancer.” *Cancer* 122(15): 2313–23.
- Gupta, Gaurav, Reinhard Glueck, and Pankaj R Patel. 2017. “HPV Vaccines: Global Perspectives.” *Human vaccines & immunotherapeutics* 13(6): 1–4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28362244>.
- Halec, Gordana et al. 2018. “Toll-like Receptors: Important Immune Checkpoints in the Regression of Cervical Intra-Epithelial Neoplasia 2.” *International journal of cancer* 143(11): 2884–91.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74.
- Hasan, Uzma A et al. 2007. “TLR9 Expression and Function Is Abolished by the Cervical

- Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178(5): 3186–97.
- Husain, Nuzhat, and Azfar Neyaz. 2017. "Human Papillomavirus Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Controversies and New Concepts." *Journal of oral biology and craniofacial research* 7(3): 198–205.
- Korniluk, Aleksandra, Halina Kemon, and Violetta Dymicka-Piekarska. 2014. "Multifunctional CD40L: Pro- and Anti-Neoplastic Activity." *Tumour Biology* 35(10): 9447–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4213374/>.
- Lau, Laura, Elizabeth E Gray, Rebecca L Brunette, and Daniel B Stetson. 2015. "DNA Tumor Virus Oncogenes Antagonize the CGAS-STING DNA-Sensing Pathway." *Science (New York, N.Y.)* 350(6260): 568–71.
- Lechien, Jerome R et al. 2019. "Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review." *Cells* 8(9).
- Litwin, Tamara R, Megan A Clarke, Michael Dean, and Nicolas Wentzensen. 2017. "Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis." *Viruses* 9(8): 206. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771191>.
- Luo, Xiaobo et al. 2020. "HPV16 Drives Cancer Immune Escape via NLRX1-Mediated Degradation of STING." *The Journal of clinical investigation* 130(4): 1635–52.
- Ma, Wenbin et al. 2011. "Coordinate Activation of Inflammatory Gene Networks, Alveolar Destruction and Neonatal Death in AKNA Deficient Mice." *Cell Research* 21(11): 1564–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365639/>.
- Ma, Wenbo, Cornelis Jm Melief, and Sjoerd H van der Burg. 2017. "Control of Immune Escaped Human Papilloma Virus Is Regained after Therapeutic Vaccination." *Current opinion in virology* 23: 16–22.
- Magee, C N, O Boenisch, and N Najafian. 2012. "The Role of Costimulatory Molecules in Directing the Functional Differentiation of Alloreactive T Helper Cells." *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(10): 2588–2600.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22759274>.

- Manzo-Merino, Joaquin et al. 2018. "The Human Papillomavirus (HPV) E6 Oncoprotein Regulates CD40 Expression via the AT-Hook Transcription Factor AKNA." *Cancers* 10(12).
- de Martel, Catherine, Martyn Plummer, Jerome Vignat, and Silvia Franceschi. 2017. "Worldwide Burden of Cancer Attributable to HPV by Site, Country and HPV Type." *International journal of cancer* 141(4): 664–70.
- Martinez-Nava, G A et al. 2015. "Cervical Cancer-Associated Promoter Polymorphism Affects Akna Expression Levels." *Genes and immunity* 16(1): 43–53.
- Martínez-Nava, G A et al. 2015. "Cervical Cancer-Associated Promoter Polymorphism Affects Akna Expression Levels." *Genes and immunity* 16(1): 43–53.
- Moliterno, Alison R, and Linda M S Resar. 2011. "AKNA: Another AT-Hook Transcription Factor 'Hooking-up' with Inflammation." *Cell Research* 21(11): 1528–30.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365640/>.
- Morbini, P et al. 2019. "The Evolving Landscape of Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma at a Single Institution in Northern Italy." *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale* 39(1): 9–17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30936574>.
- Nakashima, Kazufumi et al. 2014. "Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Oropharynx and Urine among Sexually Active Men: A Comparative Study of Infection by Papillomavirus and Other Organisms, Including Neisseria Gonorrhoeae, Chlamydia Trachomatis, Mycoplasma Spp., and Ureapl." *BMC infectious diseases* 14: 43.
- O'Neill, Rachel E, and Xuefang Cao. 2019. "Co-Stimulatory and Co-Inhibitory Pathways in Cancer Immunotherapy." *Advances in cancer research* 143: 145–94.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31202358>.
- Park, J S et al. 2000. "Inactivation of Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein. Implication for the E7-Mediated Immune Evasion Mechanism in Cervical Carcinogenesis." *The Journal of biological chemistry* 275(10):

6764–69.

- Perales, Guillermo et al. 2010. "A Polymorphism in the AT-Hook Motif of the Transcriptional Regulator AKNA Is a Risk Factor for Cervical Cancer." *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 15(5): 470–74.
- Perea, S E, P Massimi, and L Banks. 2000. "Human Papillomavirus Type 16 E7 Impairs the Activation of the Interferon Regulatory Factor-1." *International journal of molecular medicine* 5(6): 661–66.
- Ren, Shuling et al. 2020. "HPV E2, E4, E5 Drive Alternative Carcinogenic Pathways in HPV Positive Cancers." *Oncogene* 39(40): 6327–39.
- Ronco, L V, A Y Karpova, M Vidal, and P M Howley. 1998. "Human Papillomavirus 16 E6 Oncoprotein Binds to Interferon Regulatory Factor-3 and Inhibits Its Transcriptional Activity." *Genes & development* 12(13): 2061–72.
- Sasagawa, Toshiyuki, Toshiyuki Maehama, Kazuhisa Ideta, and Takuya Irie. 2016. "Population-Based Study for Human Papillomavirus (HPV) Infection in Young Women in Japan: A Multicenter Study by the Japanese Human Papillomavirus Disease Education Research Survey Group (J-HERS)." *Journal of medical virology* 88(2): 324–35.
- Schiffman, Mark et al. 2007. "Human Papillomavirus and Cervical Cancer." *The Lancet* 370(9590): 890–907.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607614160>.
- Schiller, John T, and Douglas R Lowy. 2014. "Virus Infection and Human Cancer: An Overview." *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 193: 1–10.
- Scott, Mark E, Yifei Ma, Sepideh Farhat, and Anna-Barbara Moscicki. 2015. "Expression of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors Predicts HPV16 Clearance Associated with an E6-Directed Cell-Mediated Response." *International journal of cancer* 136(10): 2402–8.
- Shaikh, Mushfiq H, Vuk Bortnik, Nigel Aj McMillan, and Adi Idris. 2019. "CGAS-STING

- Responses Are Dampened in High-Risk HPV Type 16 Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells." *Microbial pathogenesis* 132: 162–65.
- Sharpe, Arlene H. 2009. "Mechanisms of Costimulation." *Immunological reviews* 229(1): 5–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426211>.
- Siddiqua, A et al. 2001. "Regulation of CD40 and CD40 Ligand by the AT-Hook Transcription Factor AKNA." *Nature* 410(6826): 383–87.
- Sims-Mourtada, Jennifer C et al. 2005. "The Human AKNA Gene Expresses Multiple Transcripts and Protein Isoforms as a Result of Alternative Promoter Usage, Splicing, and Polyadenylation." *DNA and cell biology* 24(5): 325–38.
- Stanley, Margaret A. 2012. "Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus." *Clinical microbiology reviews* 25(2): 215–22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491770>.
- Subbarayan, Rahul Sridhar, Levi Arnold, Juan Pineda Gomez, and Sufi Mary Thomas. 2019. "The Role of the Innate and Adaptive Immune Response in HPV-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." *Laryngoscope investigative otolaryngology* 4(5): 508–12.
- Taberna, M et al. 2017. "Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Cancer." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28(10): 2386–98.
- Um, Soo-Jong et al. 2002. "Abrogation of IRF-1 Response by High-Risk HPV E7 Protein in Vivo." *Cancer letters* 179(2): 205–12.
- Villagomez-Ortiz, Vicente Jose et al. 2016. "[Prevalence of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx]." *Cirugia y cirujanos* 84(5): 363–68.
- Wang, Gang, Dan Sun, Wenhui Li, and Yan Xin. 2020. "AKNA Is a Potential Prognostic Biomarker in Gastric Cancer and Function as a Tumor Suppressor by Modulating EMT-Related Pathways." *BioMed research international* 2020: 6726759.
- Westrich, Joseph A., Cody J. Warren, and Dohun Pyeon. 2017a. "Evasion of Host Immune Defenses by Human Papillomavirus." *Virus Research* 231: 21–33.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170216305627> (February 14, 2019).

Westrich, Joseph A, Cody J Warren, and Dohun Pyeon. 2017b. "Evasion of Host Immune Defenses by Human Papillomavirus." *Virus research* 231: 21–33.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27890631>.

Woodman, Ciaran B J, Stuart I Collins, and Lawrence S Young. 2007. "The Natural History of Cervical HPV Infection: Unresolved Issues." *Nature reviews. Cancer* 7(1): 11–22.

Wu, Lizhen et al. 2018. "KDM5 Histone Demethylases Repress Immune Response via Suppression of STING." *PLoS biology* 16(8): e2006134.

Zhou, Chenhao, Zewen Kelvin Tuong, and Ian Hector Frazer. 2019. "Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System." *Frontiers in oncology* 9: 682. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31428574>.

XIX. Anexos

Anexo 1.

Soluciones

1.1 Solución de recuperación de citratos

2mL de citrato

30mL H₂O miliquo

1.2 Dilución de anticuerpo 1° para IHQ (Dilución 1:100)

170.6 µL de Agua de ampolleta

20 µL Tris 1M Ph 7.4

7.4 µL NaCl

2 µL Ab primario

Anexo 2. Constancias que acreditan participación en congresos nacionales

2.1. Constancia de presentación del trabajo en la 5ª reunión anual del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer (C-MIC) realizada en la ciudad de Puebla en septiembre de 2018.



2.2. Constancia de presentación del trabajo en el 4º Congreso de la AMIINSHAE realizado en la Ciudad de México en noviembre de 2018.



AMIINSHAE

La Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, A.C.

Otorga el presente reconocimiento a:

Cárdenas-Vallarta Diana Laura, Castro-Muñoz Leonardo J, Madrid-Marina Vicente, Lizano-Soberón Marcela & Manzo-Meirino Joaquín

por su participación con el trabajo

La expresión de AKNA está disminuida en cáncer de orofaringe positivo a VPH

en el 4to. Congreso de la AMIINSHAE, llevado a cabo los días 8 y 9 de noviembre de 2018 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez
Presidencia Colegiada

M. en C. María del Carmen Parra Cid
Representante del Comité Organizador

2.3. Constancia de presentación del trabajo en el XI Congreso Nacional de la Virología realizado en en la Ciudad de Guanajuato, México el 7 de septiembre de 2019.



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

CONSTANCIA

a **CÁRDENAS-VALLARTA DIANA LAURA**, Castro-Muñoz Leonardo Josué, Reyes-Hernández Diego Octavio, Morán-Torres Adriana, Madrid-Marina Vicente, Lizano-Soberón Marcela, Ramírez-Alcántara Katia Monserrat & Manzo-Merino Joaquín.

por su valiosa exposición del trabajo libre en CARTEL intitulado
The Human Papillomavirus regulates AKNA levels through p53 and its expression is altered in oropharyngeal cancer

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

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

Dr. Ramón González García Conde
Presidente
Sociedad Mexicana de Virología AC
Folio: XICNV-C043



QFB Lissete Valenzuela Fabris
Presidenta
Asociación Mexicana de Bioseguridad AC