



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**VALIDACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES PRONÓSTICOS
EN PACIENTES MEXICANOS CON CÁNCER DE CABEZA Y
CUELLO DEPENDIENTES DEL ESTATUS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO.**

**INFORME FINAL DE SERVICIO
SOCIAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :
JUAN CARLOS GUTIÉRREZ NAVA**

JURADO DE EXAMEN

**DIRECTORA: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
ASESOR: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON
ASESOR: DR. LEONARDO TRUJILLO CIRILO
SINODAL: M. EN. C. REYNALDA PÉREZ ROLDÁN
SINODAL: M. EN. C. ANA ROCIO RIVERA MARTÍNEZ**



CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo forma parte del proyecto Validación de biomarcadores asociados al desarrollo y pronóstico de neoplasias atribuidas a la infección del Virus del Papiloma Humano con número de registro R-2017-3602-31 ante el Comité Local de Ética e Investigación del IMSS y fue financiado por la convocatoria sobre temas prioritarios de salud, población vulnerable y temas emergentes, específicamente en el rubor temas prioritarios Cáncer/neoplasias malignas 2023 del IMSS.

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, UNAM, por brindarme la oportunidad de estudiar y conocer a personas que a día de hoy puedo considerar amigos.

A la Dra. Patricia Piña Sánchez, por abrirme las puertas de su laboratorio, orientarme, enseñarme y sobre todo, por la paciencia para poder concluir esta etapa de mi vida.

A la Dra. Rosario Castro Oropeza, por ser una guía y compañera dentro del laboratorio, agradezco mucho su apoyo y las veces que me resolvió las dudas sobre los procedimientos y fundamentos.

A mis compañeras de laboratorio, por hacer el ambiente más ameno. Lic. Dayra, Lic. Ale, M. en C. Fer y también a la M. en C. Patsy, espero que logren sus metas.

A todos los docentes y compañeros que estuvieron durante la carrera, en algún punto de mi vida fueron importantes, algo de ustedes siempre estará conmigo.

Dedicatoria

A mi madre, quien siempre estuvo conmigo en todo momento, apoyándome y guiándome, no solo en la escuela, sino también en la vida. Te amo con todo mi corazón, mi logro también es tuyo.

ÍNDICE

Resumen.	7
Introducción.	8
Cáncer	8
Cáncer de cabeza y cuello	9
Epidemiología	10
Factores de riesgo.	12
Virus del papiloma humano y Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.	16
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello positivos y negativos para el Virus de Papiloma Humano.	19
Biomarcadores en cáncer de cabeza y cuello.	20
Antecedentes.	22
KLF10.	23
SLIRP	24
AREG	24
LIMA1.	25
Justificación	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares.	26
Material y Método.	27
Selección de muestras biológicas	27
Microarreglo de parafina.	28
Inmunohistoquímica para AREG, SLIRP, LIMA1 Y KLF10.	28
Resultados.	30
La expresión de AREG es menor en HNSCC con la presencia del Virus del Papiloma humano.	31
La proteína SLIRP se sobreexpresa en cáncer de cavidad oral negativo a el Virus del Papiloma Humano.	32
Sobreexpresión de LIMA1 en cáncer de cabeza y cuello negativo a el Virus del Papiloma Humano.	34
Sobreexpresión de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello negativo a el Virus del Papiloma Humano.	35

Discusión de resultados.	38
Conclusiones.	42
Referencias.	43

Resumen.

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, HNSCC por sus siglas en inglés, son un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan en el epitelio que recubre las mucosas del tracto aerodigestivo superior. La infección por el virus del papiloma humano (VPH), asociada a un grupo de estas neoplasias, las convierte en una enfermedad con características clínicas y biológicas diferentes al cáncer de cabeza y cuello VPH negativo. Por ello, para la etapificación de carcinomas de orofaringe se requiere diferenciar los casos VPH positivos (VPH+) de los VPH negativos (VPH-), esto se determina mediante la detección de la sobreexpresión de p16, considerado marcador de la transformación inducida por VPH. En México, los estudios moleculares sobre las características del HNSCC son escasos, siendo el realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular (Méndez-Matías *et al.*, 2021) uno de los primeros en caracterizar el perfil de expresión génica en pacientes mexicanos con HNSCC, que comparan los casos VPH+/p16+ contra VPH-/p16-. Por tal motivo, en el presente trabajo se seleccionaron cuatro transcritos diferencialmente expresados asociados a la supervivencia para su validación a nivel de proteína: AREG, SLIRP, LIMA1 y KLF10. Se elaboró un microarreglo de tejidos embebidos en parafina y posteriormente se realizó la detección de las proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ). La evaluación de la intensidad de expresión reveló que las proteínas SLIRP, LIMA1 y KLF10 se sobreexpresan en pacientes VPH- en comparación con los VPH+, siendo el grupo de baja expresión los que presentan una supervivencia más prolongada, por lo que se sugiere que estas proteínas se encuentran implicadas en la progresión del HNSCC y su uso como biomarcador podría ayudar a estratificar pacientes con mal pronóstico.

Introducción.

Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un grupo amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se produce cuando las células normales se transforman en células tumorales a través de varias etapas que, generalmente en los tumores sólidos, consiste en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Las alteraciones son el resultado de la exposición prolongada a diferentes agentes carcinógenos, como algunos factores físicos, químicos y biológicos (OMS, 2022). Hanahan y Weinberg, describieron el conjunto de capacidades adquiridas por las células humanas durante su progresión hacia un tumor maligno, las cuales son: mantener la señalización proliferativa, evadir la supresión de crecimiento, evasión de la apoptosis, habilidades replicativas, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Más adelante añadieron la inestabilidad y mutación del genoma y la inflamación promotora de tumores como nuevas características; además, plantearon la existencia de dos señales emergentes: reprogramación del metabolismo celular y la evasión a la respuesta inmune (Hanahan y Weinberg, 2011); finalmente, proponen la existencia de 14 características fundamentales que expresan todos los tipos de células cancerosas durante su desarrollo (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2022).

Figura 1. Características del cáncer.



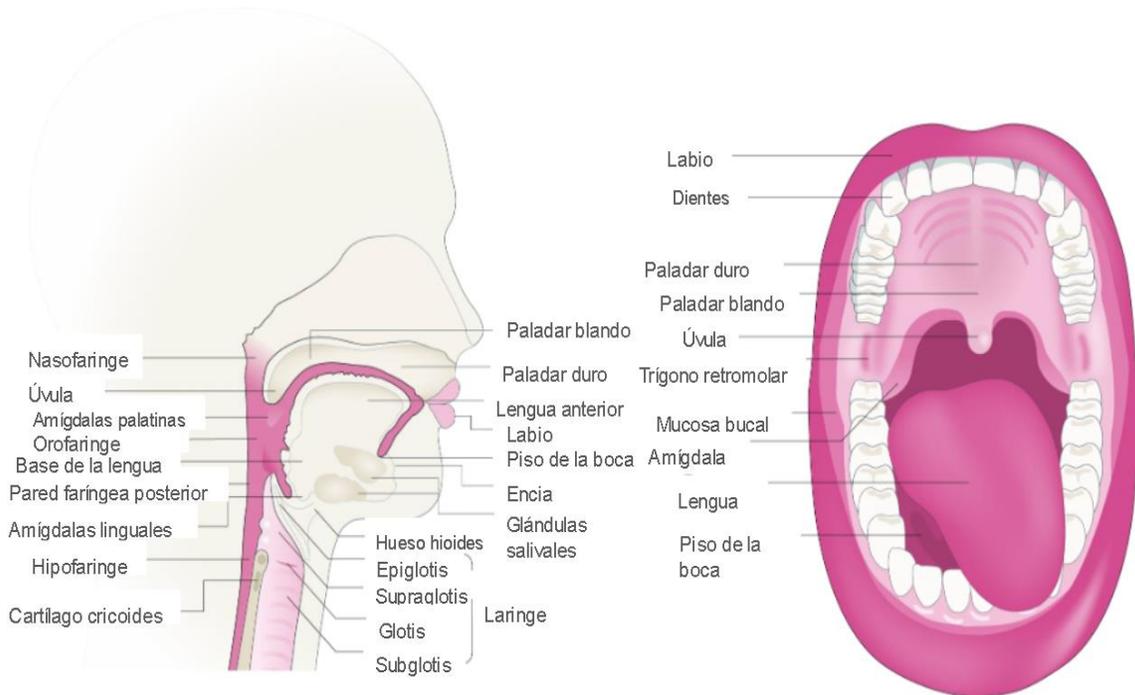
Características del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg. Tomado de *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*, Hanahan y Weinberg, 2022, <https://aacrjournals.org/view-large/figure/13775746/31fig6.jpeg>

Cáncer de cabeza y cuello.

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC por sus siglas en inglés) comprende un grupo diverso de tumores que se originan en el epitelio que recubre las mucosas del área aerodigestiva superior; de manera general se reconocen tres sitios anatómicos, la cavidad oral, laringe y orofaringe, que se dividen en los subsitios: labios, mucosa bucal, paladar duro, lengua, piso de la boca, triángulo retromolar, nasofaringe, amígdalas palatinas, amígdalas linguales, base de la lengua, paladar blando, úvula, pared faríngea posterior, hipofaringe (se extiende desde el hueso hioides hasta el cartílago cricoides), epiglotis, supraglotis, glotis y subglotis (Figura 2). El cáncer de cavidad oral y laringe generalmente son asociados con el consumo del alcohol y tabaco, mientras que el cáncer de orofaringe se atribuye principalmente a la infección por el virus

del papiloma humano (VPH), particularmente VPH 16; sin embargo, ningún sitio queda exento a la exposición de ambos factores etiológicos, por lo tanto, el HNSCC se puede separar en HNSCC VPH positivo o VPH negativo (Gallegos-Hernández, 2015; Spence *et al.*, 2016).

Figura 2. Sitios anatómicos del cáncer de cabeza y cuello.



Sitios y subsitios anatómicos del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; los HNSCC asociados a VPH surgen principalmente en las amígdalas palatinas y linguales de la orofaringe, mientras que los HNSCC no asociados surgen fundamentalmente en la cavidad oral, la hipofaringe y laringe. Tomado de *Head and neck squamous cell carcinoma*, Johnson *et al.*, 2020, <https://www.nature.com/articles/s41572-020-00224-3/figures/1>

Epidemiología.

De acuerdo con las estimaciones de GLOBOCAN para el año del 2022, el HNSCC es el octavo cáncer a nivel mundial, con aproximadamente 937,000 casos nuevos y 482,000 muertes por año, con una incidencia estandarizada por edad por cada 100,000 (ASR) de 7.32. Se estiman 389,000 casos de cáncer de labio y cavidad bucal, 189,000 de laringe,

120,000 de nasofaringe, 106,000 de orofaringe, 86,000 de hipofaringe y 55,000 de glándulas salivales (Bray *et al.*, 2024).

Es un tipo de cáncer que presenta una gran variabilidad geográfica (Robles *et al.*, 2020). La prevalencia de HNSCC en regiones del sudeste asiático y Australia se asocian con el consumo del alcohol y tabaco, mientras que, en Estados Unidos y Europa occidental, se atribuye a la infección orofaríngea causada por VPH (Mehanna *et al.*, 2013; Gillison *et al.*, 2015). En México no se cuenta con un registro actualizado sobre el HNSCC, sin embargo, se puede inferir la incidencia a nivel nacional debido al Registro Poblacional del Cáncer realizado en Mérida, Yucatán, durante el periodo del 2015-2018; en el cual, el cáncer de cavidad oral y orofaringe tuvo una ASR del 2.7 y de 1.7 para cáncer de laringe (Leal *et al.*, 2022).

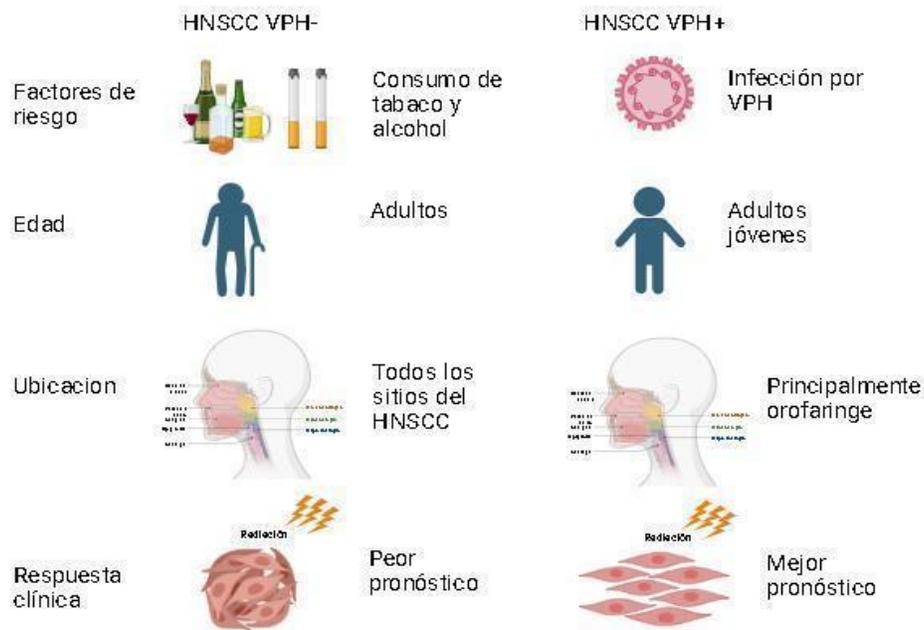
En general, los hombres tienen mayor riesgo de generar HNSCC que las mujeres; presentan una incidencia que varía de 2:1 hasta 4:1, dependiendo del sitio del tumor (Sabati y Chiocca, 2020). La edad media de diagnóstico no asociado a VPH es de 66 años, mientras que, el diagnóstico asociado al VPH se presenta en promedio a partir de los 50 años (Gillison *et al.*, 2015; Cárcamo, 2018). En las últimas décadas, la supervivencia general a cinco años ha aumentado de 55% a 66% en distintos grupos de edades y en diferentes sitios anatómicos, particularmente en los cánceres de amígdala y lengua (Pulte y Brenner, 2010). Sin embargo, en México entre el 60 y 70% de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, por lo que la supervivencia general no supera el 50%, esto se debe a diversas causas, entre los que se encuentran el desconocimiento por parte de los pacientes a los factores de riesgo, el ignorar los síntomas incipientes y un mal diagnóstico por parte de los médicos de primer contacto (Gallegos-Hernández, 2020).

Factores de riesgo.

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, los factores de riesgo para HNSCC incluyen el consumo de tabaco, alcohol, la exposición prolongada a contaminantes ambientales y agentes virales, como el VPH y el Virus de Epstein-Barr (VEB) (IARC, 2023). Otros factores de riesgo incluyen una mala higiene bucal y las dietas carentes de frutas y verduras (Freedman *et al.*, 2007; Guha *et al.*, 2007).

El consumo excesivo de alcohol y tabaco es de los factores de riesgo que mayor influyen en el desarrollo de HNSCC, ya sea de manera conjunta o independiente (Hashibe *et al.*, 2007) y se ha demostrado que los pacientes que presentan un menor o nulo consumo de estas sustancias tóxicas tienen una supervivencia general más elevada, en comparación con aquellos pacientes que sí las consumen (León *et al.*, 2023). La infección persistente de VPH es reconocida como uno de los factores etiológicos de mayor riesgo para HNSCC (Figura 3), surge principalmente en la orofaringe y se transmite a través del sexo oral. Diversos estudios han demostrado que los HNSCC asociados a VPH presentan tasas de supervivencia superiores en comparación con aquellos negativos para VPH, particularmente en orofaringe (Fakhry *et al.*, 2017).

Figura 3. Factores de riesgo para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.



Factores de riesgo para los HNSCC VPH positivos y negativos. Tomado y modificado de *Metabolic regulation in HPV associated head and neck squamous cell carcinoma*, Chandel *et al.*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118236>

Ninguna estrategia de detección ha demostrado ser totalmente eficaz y la evaluación por observación cuidadosa es el principal enfoque para la detección temprana; sin embargo, la mayoría de pacientes son diagnosticados en una etapa avanzada. Anteriormente, la estadificación del HNSCC implicaba la clasificación de la enfermedad dentro de cada subsitio anatómico (Cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe) de acuerdo con el sistema tumor-nódulo-metástasis (TNM), independiente al estado de VPH (Edge *et al.*, 2010). En 2017 la Unión para el Control Internacional del Cáncer (UICC) y la Comisión Conjunta Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) publicaron la octava edición del Manual de estadificación del cáncer, en el que, para el HNSCC se incluyeron cambios que mejoran la discriminación de riesgos y la predicción de los resultados. Se introdujo la estadificación para el cáncer de orofaringe asociado y no asociado a VPH, basándose en la sobreexpresión de p16 (más del 75% de las células tumorales); además se incorpora un capítulo sobre las neoplasias malignas cutáneas específicas de cabeza y

cuello (Lydiatt *et al.*, 2017); En la Tabla 1 se observa un resumen comparativo con los cambios más importantes para la estadificación de HNSCC, específicamente para carcinomas de orofaringe.

Tabla 1. Resumen comparativo entre la 7^a y 8^a edición del Manual de estadificación del cáncer.

Cambios	7 ^a edición	8 ^a edición	
		Orofaringe VPH-	Orofaringe VPH+
Estado-T	<p>T0: no primario</p> <p>T1: tamaño ≤2cm</p> <p>T2: tamaño 2-4 cm</p> <p>T3: tamaño >4cm</p> <p>T4:</p> <p>T4a: moderadamente avanzado</p> <p>T4b: muy avanzado</p>	<p>T0: eliminado</p>	<p>T0: si se demuestra la presencia de p16+ sin evidencia de tumor primario</p> <p>Todo localmente avanzado combinado con T4</p>
	<p>N0: no implica LN</p> <p>N1: solo LN ipsilateral ≤3cm</p> <p>N2:</p> <p>N2a: solo LN ipsilateral, 2-6cm</p> <p>N2b: múltiple LN ipsilateral, todos ≤6cm</p> <p>N2c: un LN bilateral o contralateral, >6cm</p> <p>N3: LN >6cm</p>	<p style="text-align: center;">Estado clínico N</p> <p>Se mantiene N1-N2 y se agrega ENE (-)</p> <p>N3a: tamaño >6cm y ENE (-)</p> <p>N3b: Un ENE (+)</p>	
Estado N		<p style="text-align: center;">Estado patológico N</p> <p>Evidencia microscópica de ENE (+) incluyendo LNs</p> <p>N1: ≤4 LNs</p> <p>N2: >4 LNs</p>	

Estado del grupo	TNM agrupado en el mismo estado clínico o patológico	Igual que el anterior	TNM separado clínica y patológicamente
------------------	--	-----------------------	--

DOI: profundidad de invasión; **LN:** ganglio linfático; **ENE (+):** extensión extraganglionar presente; **ENE (-):** extensión extraganglionar ausente. Tomado y modificado de *Staging system for HPV throat cancer*, Head and Neck Cancer Alliance, 2017. <https://www.headandneck.org/hpvthroatcancerstaging/>

El cáncer de cavidad oral generalmente es tratado con cirugía, seguida de quimiorradiación (CRT por sus siglas en inglés) dependiendo del estadio de la enfermedad, por otro lado, la CRT tiene un enfoque principal para tratar a los cánceres que surgen en la laringe o la faringe. El HNSCC positivo para VPH tiene un pronóstico más favorable en comparación con los HNSCC negativos para VPH, por lo tanto, los estudios en curso evalúan la eficacia de la reducción de la dosis terapéutica en el tratamiento de los HNSCC positivos para VPH (NCT02281955; NCT01898494; NCT02254278) (Chera *et al.*, 2019; Yom *et al.*, 2021; Ferris *et al.*, 2022).

Con excepción de los cánceres de la cavidad oral en etapa temprana o los cánceres de laringe, la mayoría de los casos de HNSCC requieren enfoque multimodales. Uno de los medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) es el anticuerpo monoclonal anti-EGFR Cetuximab, el cual se emplea como un sensibilizador de radiación para frenar la proliferación de células cancerosas. En pacientes asociados a VPH, es empleado para aquellos que no son elegibles para el tratamiento con cisplatino; sin embargo, la radioterapia más cetuximab exhibe una supervivencia general y una supervivencia libre de progresión más baja en comparación con la radioterapia más cisplatino. Mientras que en pacientes VPH negativos, su uso como monoterapia sólo ha mostrado una tasa de respuesta positiva del 20% (Specénier y Vermorken, 2013; Rehmani e Issaeva, 2020; Gillison *et al.*, 2019). Los inhibidores de punto de control inmunológicos pembrolizumab y nivolumab son usados para los cánceres de cabeza y cuello recurrentes o metastásicos resistentes al cisplatino; además pembrolizumab está aprobado por la FDA como

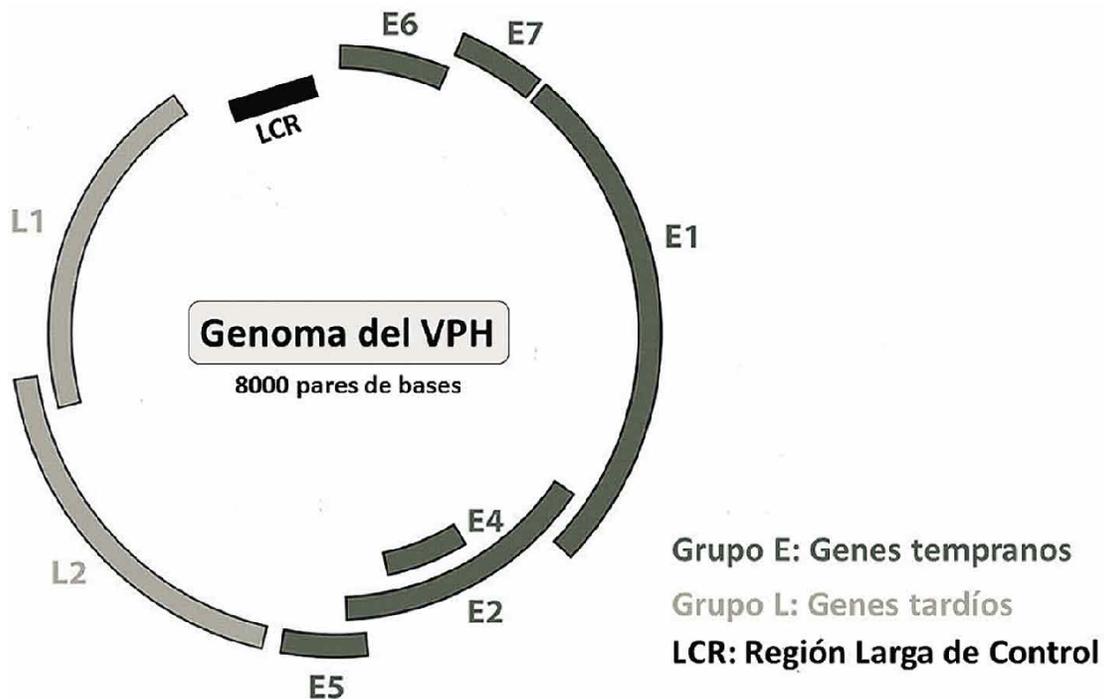
tratamiento de primera línea para el HNSCC recurrente o metastásico (Ferris *et al.*, 2016; Burtneess *et al.*, 2019).

Virus del papiloma humano y Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

El virus del papiloma humano es un virus de tamaño pequeño que pertenece a la familia *Papillomaviridae*; es desnudo y contiene 55 nanómetros de diámetro, posee una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es circular de doble cadena con aproximadamente 8,000 pares de bases, el cual se divide en tres regiones: región temprana (E) codifica seis proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); región tardía (L) codifica dos proteínas que conforman la cápside viral (L1 y L2); y la región larga de control (LCR) contiene secuencias reguladoras de replicación y transcripción viral (Figura 4) (Concha, 2007; Cozma *et al.*, 2024).

Son virus especie-específicos y epiteliotróficos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan a diferentes tipos de aves y mamíferos. Normalmente, la infección por VPH es asintomática, transitoria y puede pasar desapercibida; en otros casos, desencadena la formación de crecimientos benignos, verrugas o papilomas, hasta el desarrollo de cáncer (Mateos *et al.*, 2016). Existen 231 tipos diferentes de VPH que se pueden dividir en grupos de alto y bajo riesgo, en función de su capacidad para impulsar la transformación maligna (International Human Papillomavirus Reference Center, 2023). Los tipos de alto riesgo son el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 66, y se encuentran implicados en el cáncer cervicouterino, cabeza y cuello, ano, vagina, vulva y pene; mientras que los VPH de bajo riesgo son el 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 73 y 81 y se asocian con lesiones benignas clínicamente visibles (Muñoz *et al.*, 2003; Spence *et al.*, 2016; Minchado *et al.*, 2020). De estos, el tipo de alto riesgo más implicado para el desarrollo de HNSCC es VPH 16, que representa hasta 80% de los casos positivos de VPH (Ndiaye *et al.*, 2014), mientras otros genotipos de alto riesgo (VPH 33, 35 y 56) se encuentran en un porcentaje menor (Bratman *et al.*, 2016).

Figura 4. Estructura genómica del virus del papiloma humano.



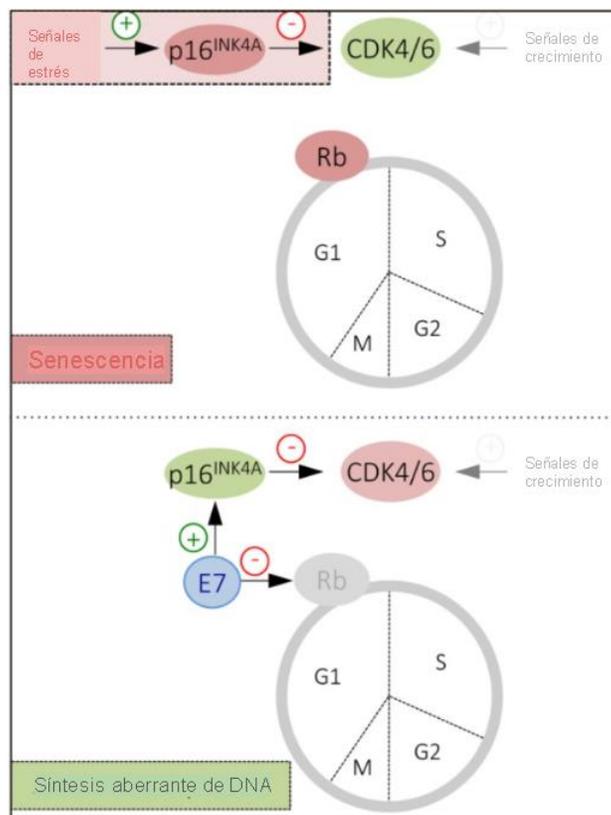
Estructura genómica del VPH de alto riesgo. Tomado de *Human Papilloma virus in Oral and Oropharyngeal Cancer. Review of the Literature*, Contreras y Venegas, 2015. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300012>

El ciclo de vida del VPH se compone de diversas fases; comienza con la infección de las células basales indiferenciadas del epitelio, en donde se mantienen con un número de copias bajo. En la fase reproductiva se lleva a cabo la expresión de los genes tempranos que codifican las proteínas E1, E2 y E4 y las oncoproteínas E5, E6 y E7, en conjunto, se encargan de la replicación, transcripción, proliferación y desregularización del ciclo celular, lo que provoca una amplificación viral de hasta 1,000 copias por célula; posteriormente se lleva a la expresión de los genes tardíos L1 y L2, que se encargan de la producción y liberación de las partículas virales maduras en las capas superiores del epitelio diferenciado (Concha, 2007; Rautava y Syrjänen, 2012). El potencial oncogénico del VPH se explica principalmente por la expresión de los genes que codifican para las oncoproteínas E6 y E7. La oncoproteína E6 se une a la proteína p53 y media su degradación. Por otro lado, E7 se une al supresor de tumores del retinoblastoma (pRB) y produce la liberación de los factores de transcripción E2F que son necesarios para la

transcripción de genes relacionados con la proliferación celular y progresión del ciclo celular. Los genotipos de VPH de alto riesgo tienen una mayor afinidad por p53 y pRB, en comparación con los VPH de bajo riesgo (Marwan *et al.*, 2015; Lagunas, 2018).

La expresión de la oncoproteína E7 de los VPH de alto riesgo desencadena una defensa conocida como senescencia inducida por oncogén, que está mediada por el supresor de tumores p16 y ejecutada por pRB. En condiciones normales, la expresión de p16 es inhibida epigenéticamente por complejos represivos polycomb. p16 inhibe las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4/6), lo que provoca una acumulación de pRB hipofosforilada e indica la interrupción del ciclo celular (Figura 5, panel superior); sin embargo, cuando el VPH está presente, p16 se sobreexpresa debido a que E7 provoca la degradación proteosomal de pRB (Figura 5, panel inferior) y favorece la liberación de genes para la progresión celular (Munger *et al.*, 2013).

Figura 5. Vía supresora de tumores pRB.



La oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo desencadena la expresión de p16^{INK4A} al dirigirse a pRB para su degradación. Supresor de tumores (rojo), actividades oncogénicas (verde). Tomado de *p16 in HPV-associated cancers*. Munger *et al*, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875753/figure/F1/>

Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello positivos y negativos para el Virus de Papiloma Humano.

Desde el punto de vista biológico, los HNSCC VPH positivos y los tumores VPH negativos exhiben características distintas en la expresión genética y perfiles mutacionales e inmunológicos. Los pacientes VPH+ se presentan en una edad más temprana y por lo general, no se encuentran implicados con un elevado consumo de alcohol o tabaco, pero sí con un mayor número de parejas sexuales; por el contrario, los pacientes VPH- se asocian más con un consumo elevado de tabaco, alcohol y con una mala higiene bucal (Gillison *et al.*, 2008). El VPH 16 es el principal causante de cáncer de cabeza y cuello; sin embargo, otros tipos de VPH de alto riesgo también se encuentran implicados, aunque en un porcentaje menor; se incluyen los VPH 18, 33, 35, 52 y 56 (Michaud *et al.*, 2014; Bratman *et al.*, 2016).

Los tumores HNSCC con frecuencia exhiben mutaciones en los genes CDKN2A y TP53, sin embargo, estas alteraciones se encuentran limitadas en gran medida en los tumores VPH-, debido a que en los VPH+ la acción de las oncoproteínas E6 y E7 interfieren en las vías moleculares y degradan a p53 y pRb, a su vez, estos tumores tienen mayor sensibilidad a la radiación, lo que mejora la tasa de supervivencia (Kimple *et al.*, 2013). Los tumores VPH- muestran mutaciones en los genes reguladores del estrés oxidativo NFE2L2 y KEAP1. Por otro lado, los tumores VPH+ muestran una pérdida frecuente del gen TRAF3, amplificaciones en E2F1 y amplificaciones focales en los genes que codifican los receptores de tirosina quinasa EGFR, HER2 y FGFR1 (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Biomarcadores en cáncer de cabeza y cuello.

El uso de VPH como biomarcador en HNSCC, principalmente en orofaringe, es un factor importante que se utiliza como predictor para la supervivencia; sin embargo, las pautas para la detección del VPH varían entre los estudios (Westra, 2014), por lo que se ha empleado a p16 como un sustituto confiable para determinar el estado de VPH y predecir la respuesta al tratamiento. No obstante, p16 no es capaz de diferenciar los diferentes tipos de VPH. Adicionalmente, en algunos casos puede haber sobreexpresión de p16 independientemente de VPH, o puede presentarse el VPH sin sobreexpresión de p16, por lo que es preferible analizar en conjunto con pruebas de ADN para VPH (Chang *et al.*, 2021; Kuhn *et al.*, 2021).

Por otro lado, debido a la necesidad de identificar biomarcadores moleculares que puedan predecir la progresión de las lesiones malignas de HNSCC, pronosticar la supervivencia y a la respuesta terapéutica, la búsqueda se ha centrado en definir las anomalías moleculares que caracterizan al HNSCC. Algunos biomarcadores que se han propuestos son los microARNs (ARNmi), los cuales son ARN endógenos no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que actúan mediante la unión y la represión de objetivos de RNA mensajeros (ARNm), regulando así la expresión genética (Bartel, 2004). Algunos ejemplos de ARNmi propuestos como biomarcadores se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. microARNs propuestos como biomarcadores en HNSCC.

microARNs	Función como biomarcador	Referencia
miR-9, miR-20b, miR-152	La baja expresión se relaciona con una supervivencia inferior	(Hui <i>et al.</i> , 2013; Sun <i>et al.</i> , 2016)
miR-107, miR-15, miR-107, miR-151, miR-182, miR-361, miR-324-5p, miR-361, miR492	La sobreexpresión se relaciona con una supervivencia menor	(Hui <i>et al.</i> , 2013)
miR-205 y let-7	La baja expresión se	(Childs <i>et al.</i> , 2009)

	relaciona con un mal pronóstico	
miR-210	La sobreexpresión se correlaciona con un mal pronóstico	(Gee <i>et al.</i> , 2010; Bigagli <i>et al.</i> , 2021)
miR154-5p y miR154-3p	La baja expresión se correlaciona con una mejor supervivencia	(Tomaszewska <i>et al.</i> , 2021)

El microambiente tumoral e inmunológico en pacientes HNSCC exhibe características que se asocian con el estado de VPH y repercuten en el pronóstico para la supervivencia. Los tumores VPH+ muestran un aumento en células B, células T y disminución de macrófagos y mastocitos; el aumento de células B se relaciona con un mejor pronóstico, mientras que un menor número de macrófagos se asoció con un peor pronóstico, por el contrario, los tumores VPH- muestran un nivel elevado de macrófagos, sin embargo, este aumento no interfiere con el mal pronóstico de los VPH- (Wang *et al.*, 2023). Los tumores VPH+ tienen mayor abundancia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que los VPH-, lo que repercute en un mejor pronóstico, sin embargo, aquellos pacientes VPH+ que muestran niveles bajos de TIL exhiben resultados de supervivencia similares a los pacientes VPH- (Ward *et al.*, 2014; Partlová *et al.*, 2015).

En las células cancerosas del cáncer de cabeza y cuello, existen genes que se encuentran con una expresión alterada (aumentada o disminuida) en comparación con las células normales. Es por ello, que diversos estudios se han enfocado en la identificación de biomarcadores de potencial relevancia pronóstica y terapéutica. En un estudio en el que analizaron los perfiles de expresión génica relacionada con el sistema inmunitario, se encontró que la sobreexpresión de SEMA3G, GNRH1, ZAP70 y ARG1 se correlaciona con un peor pronóstico para la supervivencia, mientras que la sobreexpresión de PLAU, SFTPA2, CCL26, DKK1, GAST, PDGFA, STC1 se relacionan positivamente, independientemente del estado de VPH (Li *et al.*, 2020). Sin embargo, diversos estudios demuestran que el estado de VPH repercute en la expresión de los genes; como en el caso de los genes NOTCH, IL17RB, IL17REL, FCER2 y SOCS1 que se sobreexpresan en pacientes HNSCC VPH positivos y se relacionan con una mejor

supervivencia (Wirth *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023); mientras que en los VPH negativos la sobreexpresión de ARG1 repercute en un peor pronóstico (Pokrývková *et al.*, 2021).

Antecedentes.

Los estudios de análisis de transcriptoma en HNSCC han aportado información sobre firmas moleculares y biomarcadores asociados a VPH. En este sentido, en el Laboratorio de Oncología Molecular se analizó el perfil de expresión de transcritos en pacientes mexicanos con HNSCC atribuido a VPH y no asociado a VPH, mediante microarreglos de expresión que identifican más de 44,000 transcritos.

Se identificaron 98 genes expresados diferencialmente (GED) en muestras VPH+/p16+ versus VPH-/p16-, de los cuales, 16 se encontraban regulados positivamente y 82 negativamente. De estos, 73.4% eran ARNm y 26.5% eran ARN no codificantes; con respecto a los transcritos no codificantes, encontraron 20 RNA largos no codificantes (lncRNA) y seis ARNm. Para validar los ARNm expresados diferencialmente, se compararon los datos obtenidos con datos de El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés) con estado de VPH conocido; los resultados mostraron que 51 de los 72 genes expresados diferencialmente se validaron con éxito. De los cuales, la expresión de 47 ARNm se redujo significativamente en muestras HNSCC VPH+, incluidos KLF10, DSG1, SPRR2G, ACTN1, CCND1, HIF1A y AREG; también reportaron que los genes MUC4, MYB, ATP8B5P y SYCP2 se expresaron positivamente en tejidos HNSCC VPH+ frente a los VPH-. Posteriormente determinaron la relevancia clínica de los GED, los resultados reportados indican que 43 de los 72 ARNm estaban relacionados con la supervivencia. Los pacientes con baja expresión de SLIPRP, KLF10, ACTN1, CCDC71L, AREG, PSMD14 y LIMA1 tuvieron una mejor supervivencia en comparación con aquellos con alta expresión. Sin embargo, al momento de separar los mismos datos en función del estado de VPH, encontraron que la alta expresión de KLF10, APBB2, ACTN1, AREG, MT2A, PTPN12 y PTHLH se relacionaba con una baja supervivencia en los pacientes HNSCC VPH negativos, mientras que la alta expresión de SLC25A39 y

GJB2 se asoció con una mala supervivencia sólo en aquellos pacientes HNSCC VPH+ (Méndez-Matías *et al.*, 2021).

La investigación realizada en el laboratorio aporta más información sobre la prevalencia del VPH en pacientes mexicanos con cáncer escamoso de cabeza y cuello; además, reportan el primer perfil de expresión génica en pacientes mexicanos con HNSCC que compara VPH+/p16+ contra VPH-/p16- y contribuyen a la posible identificación de biomarcadores pronósticos que pueden fungir como objetivos terapéuticos en HNSCC. De los genes identificados con valor pronóstico se eligieron cuatro para su validación: KLF10, SLIRP, AREG y LIMA.

KLF10.

KLF10 es un miembro de la familia de los factores de transcripción SP (proteínas de especificidad) / KLF (Factores tipo Krüppel). Inicialmente denominado como gen temprano inducible 1 (TIEG1) por TGF- β (factor de crecimiento transformante β) en osteoblastos fetales humanos normales (*Subramaniam et al.*, 1995). KLF10 se expresa en diversos tejidos, como lengua, hígado, tejido adiposo y en el músculo esquelético. Es un regulador transcripcional de unión al DNA que contiene un dominio de dedo de zinc triple; al unirse al ADN interactúa con otros factores de transcripción reguladores para estimular o suprimir la expresión de varios genes en células normales y cancerosas. La alteración en la expresión de KLF10 tienen implicaciones en múltiples procesos biológicos, como la proliferación, diferenciación y la apoptosis (Memon y Lee, 2018; Luo *et al.*, 2022) que son relevantes para diferentes enfermedades como la diabetes, colitis, osteopenia, hipertrofia y esteatohepatitis no alcohólica (Rajamannan *et al.*, 2006; Gutiérrez-Aguilar *et al.*, 2007; Subramaniam *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014; Papadakis *et al.*, 2015).

KLF10 se expresa en diferentes tipos de cáncer, como próstata (Partin *et al.*, 2003), mama (Jin *et al.*, 2012), de esófago (Chen *et al.*, 2021) páncreas (Chang *et al.*, 2012; Shu-Ling *et al.*, 2021) de ovario (Jim *et al.*, 2015) y pulmón (Mishra *et al.*, 2017) en los que actúa como un supresor tumoral al inhibir la proliferación de las células cancerosas

y promover la apoptosis (Reinholz *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2020; Shu-Ling *et al.*, 2021) Sin embargo, en el estudio transcriptómico realizado por Uhlen *et al* en 2017, en el que analizaron el perfil de expresión de aproximadamente 8000 pacientes en 17 tipos distintos de cáncer, reportaron que la sobreexpresión de ARNm KLF10 en cáncer de pulmón se asocia con una supervivencia desfavorable (Uhlen *et al.*, 2017).

SLIRP.

SLIRP es una proteína de unión a ARN que interactúa con el bucle de tallo SRA; se expresa principalmente en las mitocondrias, en donde regula la expresión de genes mitocondriales (Hatchell *et al.*, 2006; Lagouge *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020), influye en la fosforilación oxidativa (Baughman *et al.*, 2009) y tiene efectos sobre la motilidad de los espermatozoides (Shan *et al.*, 2020). SLIRP se expresa en tejidos normales como en el corazón, hígado, músculo esquelético y testículos. Mientras que en tejidos cancerosos se expresa en el cáncer de mama, próstata y pulmón (Hatchell *et al.*, 2006); sin embargo, el papel de SLIRP en el cáncer aún no se ha investigado por completo (Trisciuglio *et al.*, 2016).

AREG.

La anfiregulina (AREG) es uno de los ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), identificada por Shoyab *et al* en 1989. Desempeña un papel en la reparación de tejidos, la inflamación y la inmunidad (Kennedy-Crispin *et al.*, 2012; Zeiss *et al.*, 2015). Al interactuar con EGFR, AREG desencadena una serie de eventos de señalización que son necesarios para diversos procesos fisiológicos celulares, incluidos el metabolismo, el ciclo celular y la proliferación (Shoyab *et al.*, 1989; Schneider y Lobo, 2008). La anfiregulina se expresa en sangre y en tejidos normales de ovario, placenta, glándulas mamarias, colon, esofago y pulmón (Plowman *et al.*, 1990; Busser *et al.*, 2011; Hachin *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2023).

AREG se encuentra presente en el cáncer de ovario (Bolitho *et al.*, 2021), colorrectal (Yin *et al.*, 2023), de pulmón (Busser *et al.*, 2009) de mama (Sato *et al.*, 2013), de esófago (Zhang *et al.*, 2021), y en el carcinoma de células renales (Popławski *et al.*, 2023) en los

cuales, su sobreexpresión se encuentra relacionada con un incremento en la migración y proliferación de células cancerosas, además de un peor pronóstico en la supervivencia, en comparación con los pacientes que presentan una baja expresión de AREG (Sato *et al.*, 2013; Bolitho *et al.*, 2021; Jeong *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2023). En relación con HNSCC, diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de AREG a nivel de transcrito, se relaciona con una menor supervivencia, en comparación con aquellos grupos de baja expresión (Gao *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2021; Yang y Yan, 2022). Sin embargo, es necesario analizar si a nivel de proteína tiene el mismo impacto, ya que puede haber mecanismos de regulación postranscripcional que pudiera afectar la relación transcrito-proteína.

LIMA1.

La proteína de dominio LIM y unión de actina 1 (LIMA1), también conocida como proteína epitelial perdida en neoplasias (EPLIN) es una proteína citoesquelética de unión a la actina que contiene un dominio estructural LIM. Inicialmente, fue identificada como un gen expresado diferencialmente en la carcinogénesis de células epiteliales de la cavidad oral (Chang *et al.*, 1998) y posteriormente se identificó a LIMA1 como una proteína citoesquelética que presenta dos isoformas (α y β) y tiene un dominio LIM ubicado en el centro (Raymond y Chang, 1999).

LIMA1 está implicada en el control de los filamentos de actina (Raymond *et al.*, 2003) y al unirse a la α -catenina media la interacción del complejo cadherina-catenina con la actina F y mejora la adhesión celular (Abe y Takeichi, 2008); además, en células epiteliales ayuda a mantener las uniones adherentes (Taguchi *et al.*, 2011).

La expresión de LIMA1 se a identificado en diferentes tipos de cáncer, como piel, (Zheng *et al.*, 2020) de ovario (Liu *et al.*, 2016; Caburet *et al.*, 2015) de esófago (Liu *et al.*, 2012) de próstata (Sanders *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011) de mama (Jiang *et al.*, 2008) y en cabeza y cuello (Huang *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2022) en el que se le ha implicado en procesos de motilidad celular y angiogénesis; su baja expresión de asocia con un mal pronóstico para la supervivencia en cáncer de mama, próstata y ovario (Jiang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016), mientras que en HNSCC su sobreexpresión a nivel de

transcrito se relaciona con un mal pronóstico (Huang *et al.*, 2022; Méndez-Matía *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2022).

Justificación.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello es un tipo de cáncer que abarca diferentes sitios anatómicos que presentan distintos factores etiológicos (Hashibe *et al.*, 2007; Fakhry *et al.*, 2017) entre los que destaca la infección por el Virus del Papiloma Humano. La presencia del VPH lo convierte en una enfermedad heterogénea que exhibe características únicas en comparación con el HNSCC causado por el consumo de tabaco y alcohol (Kimple *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2023). En México, los estudios sobre el HNSCC son escasos y limitados. Debido a que se han identificado transcritos que podrían estar relacionados con la sobrevida, es necesario validar su expresión a nivel de proteína para contribuir a la identificación de posibles biomarcadores pronósticos (Johnson *et al.*, 2020; Méndez-Matías *et al.*, 2021). Del mismo modo, la detección de marcadores mediante la inmunohistoquímica es un método accesible en los laboratorios de patología, los cuales son los responsables del diagnóstico histopatológico, ya que utilizan de manera rutinaria este método como herramienta para identificar distintos biomarcadores de utilidad para el diagnóstico diferencial, el pronóstico e incluso para la definición de opciones terapéuticos en diversos tipos de cáncer.

Objetivo general.

- Identificar la asociación de expresión proteica de AREG, SLIRP, LIMA1 y KLF10 en muestras con HNSCC asociados y no asociados al VPH.

Objetivos particulares.

- Identificar los tejidos de HNSCC VPH/p16 positivas (VPH+/p16+) y VPH/p16 negativas (VPH-/p16-).
- Evaluar la expresión proteica de AREG, SLIRP, LIMA1 y KLF10 en muestras de pacientes mexicanos HNSCC VPH+/p16+ y VPH-/p16-

Material y Método.

Selección de muestras biológicas.

Las muestras utilizadas para el estudio fueron recolectadas en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Fueron diagnosticadas con HNSCC durante el periodo de 2016-2022 y se identificaron a partir de la base de datos del Laboratorio de Oncología Molecular. La selección de las muestras se basó en los siguientes criterios (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios utilizados para la selección de las muestras.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Muestras de HNSCC FFPE disponibles entre 2016-2022.	Muestras cuyo material biológico sea insuficiente para la detección de VPH y la expresión de proteínas o se encuentre en mal estado.	Muestras VPH+/p16- o VPH-/p16+
Muestras de laringe, orofaringe y cavidad oral.		Resultados de detección inválidos para VPH
Muestras de HNSCC con genotipificación de VPH y detección de p16.		

De un total de 168 tejidos fijados en formalina embebidos en parafina (FFPE por sus siglas en inglés), se seleccionaron 48 para elaborar el microarreglo de tejido en parafina. Las muestras fueron separadas en los tres sitios anatómicos: laringe, orofaringe y cavidad oral, con 16 muestras cada uno; posteriormente se seleccionaron en función del estado de VPH y p16, dicho estado fue definido como: dobles positivas (VPH+/p16+) y dobles negativas (VPH-/p16-), la distribución de los datos se observa en la Tabla 4. Previamente, se evaluaron las condiciones óptimas de la inmunohistoquímica (IHQ), así como también la selección de tejidos control para la detección de las proteínas

seleccionadas (Servicio Social de Ruíz-Matamoros A. y Espinosa-López J, 2022, FES Zaragoza UNAM).

Tabla 4. Muestras de HNSCC para el microarreglo.

Estado	Orofaringe	Laringe	Cavidad Oral	Total
VPH+/ p16+	12	8	8	28
VPH-/ p16-	4	8	8	20
Total	16	16	16	48

Microarreglo de parafina.

El microarreglo se elaboró en el equipo Advanced Tissue Arrayer ATA100, con agujas para tejido de un milímetro de diámetro. Cada muestra se colocó por duplicado en el microarreglo y se incluyeron tejidos de testículo y riñón como controles internos, el orden del microarreglo se observa en la figura 6.

Figura 6. Mapa del microarreglo.

HN187	HN187	HN201	HN201	HN204	HN204	<i>HN362</i>	<i>HN362</i>	<i>HN353</i>	<i>HN353</i>	<u>HN230</u>	<u>HN230</u>	<u>HN447</u>	<u>HN447</u>
HN248	HN248	HN249	HN249	HN250	HN250	<i>HN287</i>	<i>HN287</i>	<i>HN271</i>	<i>HN271</i>	<u>HN434</u>	<u>HN434</u>	<u>HN469</u>	<u>HN469</u>
HN234	HN234	HN217	HN217	HN232	HN232	<i>HN327</i>	<i>HN327</i>	<i>HN282</i>	<i>HN282</i>	<u>HN451</u>	<u>HN451</u>	<u>HN466</u>	<u>HN466</u>
HN254	HN254	HN244	HN244	HN226	HN226	<i>HN220</i>	<i>HN220</i>	<i>HN291</i>	Riñón	<u>HN203</u>	<u>HN203</u>	Testículo	HN236
HN252	HN252	HN251	HN251	HN247	HN247	<i>HN293</i>	<i>HN293</i>	<i>HN341</i>	<i>HN341</i>	<u>HN229</u>	<u>HN229</u>	<u>HN183</u>	<u>HN183</u>
Testículo	Testículo	Riñón	Riñón	HN14	HN211	<i>HN393</i>	<i>HN393</i>	<i>HN219</i>	<i>HN219</i>	<u>HN475</u>	<u>HN475</u>	<u>HN241</u>	<u>HN241</u>
						<i>HN389</i>	<i>HN389</i>	<i>HN290</i>	<i>HN290</i>	<u>HN235</u>	<u>HN235</u>	<u>HN215</u>	<u>HN215</u>
						<i>HN390</i>	<i>HN390</i>	<i>HN310</i>	<i>HN310</i>	<u>HN472</u>	<u>HN472</u>	<u>HN421</u>	<u>HN421</u>

El color amarillo corresponde a las muestras dobles positivas (VPH+/ p16+), el color azul a las dobles negativas (VPH-/ p16-), y el color gris a los controles utilizados. Las muestras de orofaringe se ubican en el lado izquierdo (en negritas), laringe en el centro (en cursivas) y cavidad oral en el derecho (subrayadas).

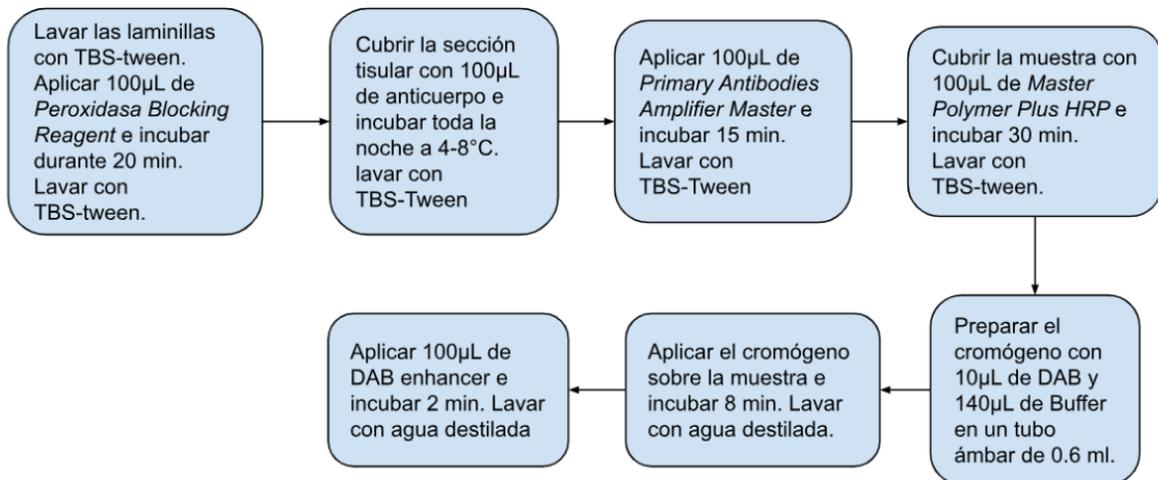
Inmunohistoquímica para AREG, SLIRP, LIMA1 Y KLF10.

Una vez elaborado el microarreglo, se realizaron diversos cortes histológicos de cinco micras de espesor y se montaron en portaobjetos electrocargados. Las laminillas se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se sumergieron en Tris-EDTA-Buffer pH9 y

se colocaron en el equipo KOS Milestone para exponer el antígeno bajo las condiciones: 17°C, módulo 16s, 15 minutos. Una vez finalizado el protocolo, se marcó el contorno del tejido con un lápiz de parafina para evitar el derrame de los reactivos durante la manipulación o agitación de las laminillas.

La IHQ se realizó con los anticuerpos Anti-AREG (ID: HPA008720), Anti-SLIRP (ID: HPA020291), Anti-LIMA1 (ID: HPA052645) y Anti-KLF10 (ID: SAB4502970) de la marca Sigma-Aldrich, con Antibody diluent (MAD-004048R-100) de Máster Diagnóstica, con las siguientes concentraciones: Anti-AREG [1:50µL], Anti-SLIRP [1:25µL], Anti-LIMA1 [1:50µL] y Anti-KLF10 [1:100µL]; se utilizó el kit de detección Master Polymer Plus Detection System (peroxidase) de Máster Diagnóstica, siguiendo el protocolo elaborado en laboratorio (Figura 7). Al finalizar, los portaobjetos se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con resina sintética.

Figura 7. Resumen del protocolo para IHQ.



Todas las incubaciones se realizaron en la cámara húmeda para IHQ y se agitaron en el orbitador Labnet Orbit LS a 60 rpm.

Después de llevar a cabo la IHQ para cada microarreglo con el anticuerpo correspondiente, se determinó la intensidad de la expresión a través de una evaluación cualitativa de la región tumoral. Los valores se clasificaron como: 0 (sin tinción), 1 (débil),

2 (moderado) y 3 (fuerte). Posteriormente se determinó el nivel de intensidad mediante un porcentaje calculado en un rango de 0 a 100%. En este contexto, el valor 0 representa el 0%, el 1 corresponde al 33%, el valor 2 indica el 66% y el valor 3 representa el 100%.

Finalmente se utilizó el software GraphPad Prism (versión 8.0.2) para el análisis estadístico y la elaboración de gráficas. La prueba U de Mann-Whitney se empleó para determinar la diferencia de expresión entre el grupo VPH+/p16+ y VPH-/p16-, los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados.

Cada portaobjetos contó con un número distinto de muestras debido a la manipulación durante el montaje y elaboración de la IHQ (Tabla 5). Después de realizar la IHQ para cada proteína y analizar la puntuación de la intensidad de expresión, los resultados mostraron diferencias significativas solo en tres de las cuatro proteínas evaluadas.

Tabla 5. Número de muestras para cada portaobjetos.

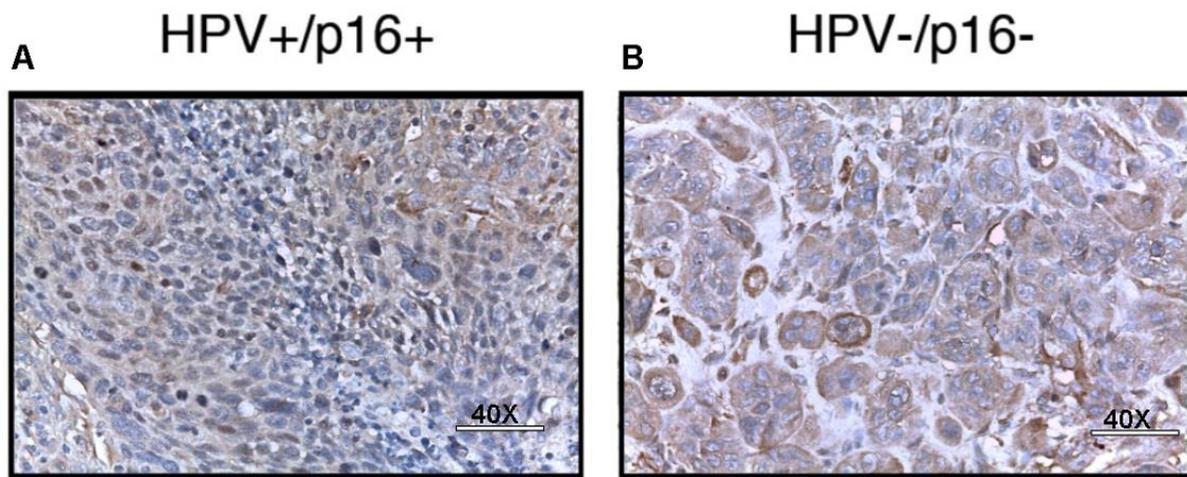
AREG				
Estado	Orofaringe	Laringe	Cavidad Oral	Total
VPH+/ p16+	11	5	5	21
VPH-/ p16-	3	5	8	16
Total	14	10	13	37
SLIRP				
Estado	Orofaringe	Laringe	Cavidad Oral	Total
VPH+/ p16+	11	6	5	22
VPH-/ p16-	3	7	8	18
Total	14	13	13	40
LIMA1				
Estado	Orofaringe	Laringe	Cavidad Oral	Total
VPH+/ p16+	11	3	5	19
VPH-/ p16-	3	4	5	12
Total	14	7	10	31

KLF10				
Estado	Orofaringe	Laringe	Cavidad Oral	Total
VPH+/ p16+	11	6	5	22
VPH-/ p16-	3	6	7	16
Total	14	12	12	38

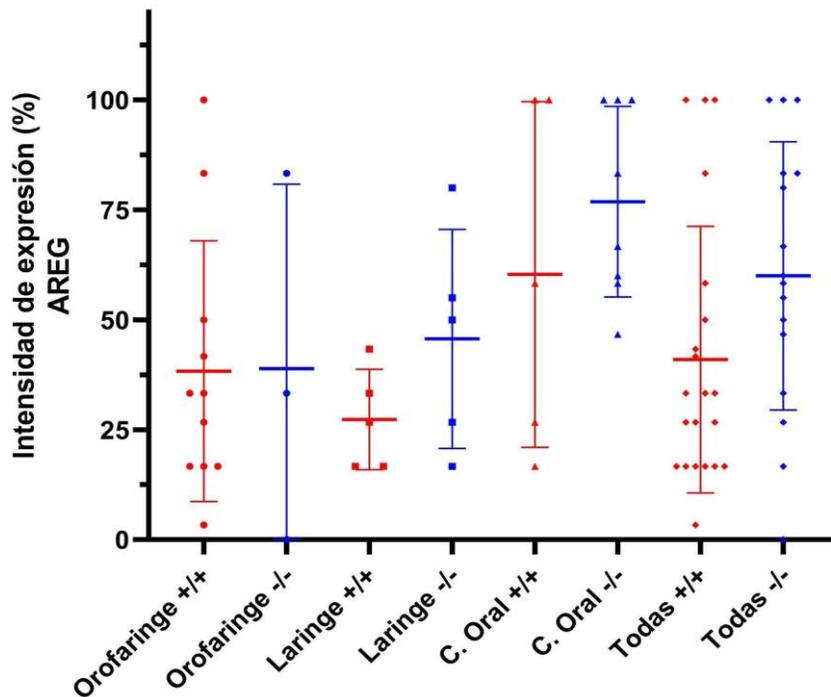
La expresión de AREG es menor en HNSCC con la presencia del Virus del Papiloma humano.

El portaobjetos de AREG contó con la cantidad final de 37 muestras. Después del análisis, no se encontró diferencia estadística ($p=0.501$) en la expresión proteica entre los diferentes sitios de cáncer de cabeza y cuello, pese a la tendencia observada (Figura 8). La representación de los datos separados por sitio anatómico y estado de VPH/p16 se observa en la gráfica 1.

Figura 8. Expresión proteica de AREG en cáncer de cabeza y cuello



(A) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de laringe VPH+/p16+ (HN 287, 16%); (B) Ejemplo de la intensidad de expresión cáncer de laringe VPH-/p16- (HN 293, 50%).

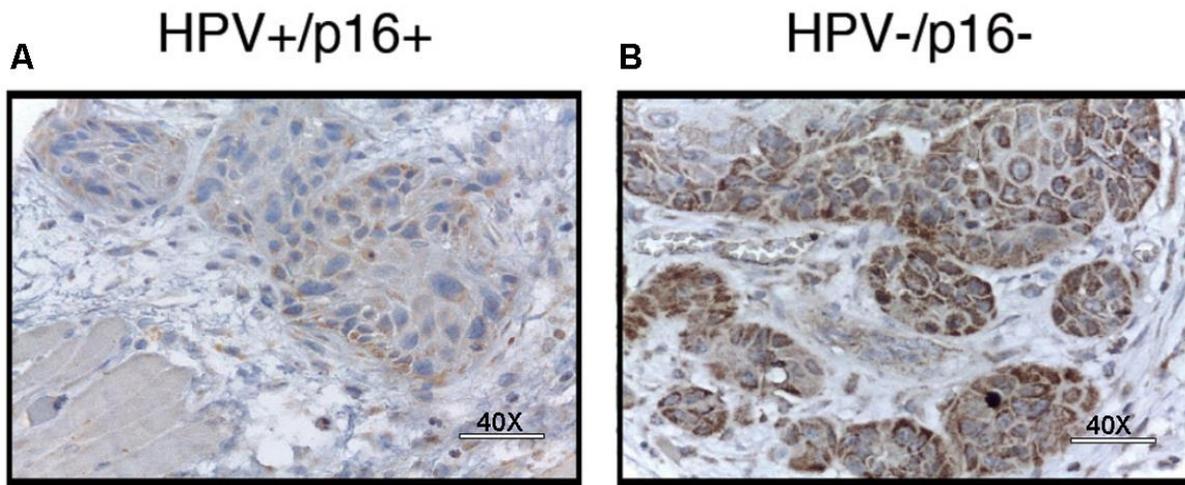


Gráfica 1. Gráfica de expresión proteica de AREG en tejidos VPH+/p16+ y VPH-/p16-. El color rojo corresponde a las muestras dobles positivas y el color azul a las muestras dobles negativas; la prueba estadística no mostró diferencia significativa.

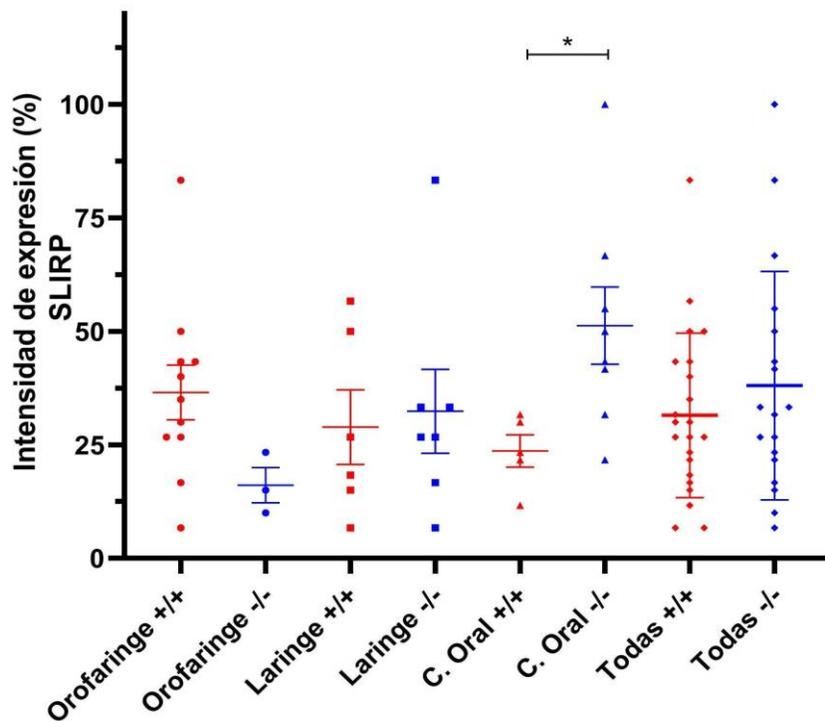
La proteína SLIRP se sobreexpresa en cáncer de cavidad oral negativo a el Virus del Papiloma Humano.

La sobreexpresión de la proteína SLIRP se observó en pacientes VPH- con cáncer de cavidad oral, en comparación con los VPH+ que tuvieron baja expresión (Figura 9, Gráfica 2).

Figura 9. Expresión proteica de SLIRP en cáncer de cabeza y cuello.



(A) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de cavidad oral VPH+/p16+ (HN 469, 31%); (B) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de cavidad oral VPH-/p16- (HN 235, 66%).

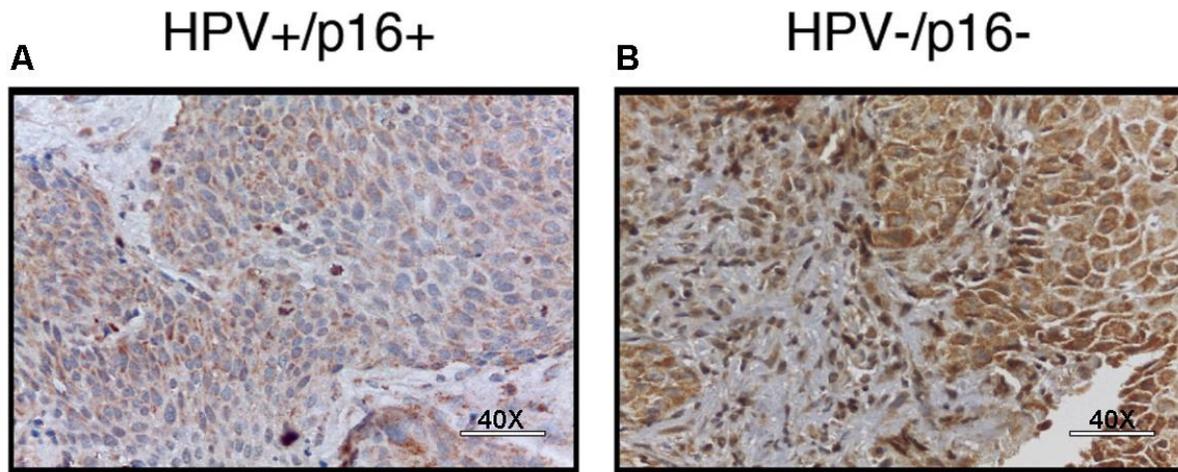


Gráfica 2. Gráfica de expresión proteica de SLIRP en tejidos VPH+/p16+ y VPH-/p16-. El color rojo corresponde a las muestras dobles positivas y el color azul a las muestras dobles negativas. * = $p < 0,05$.

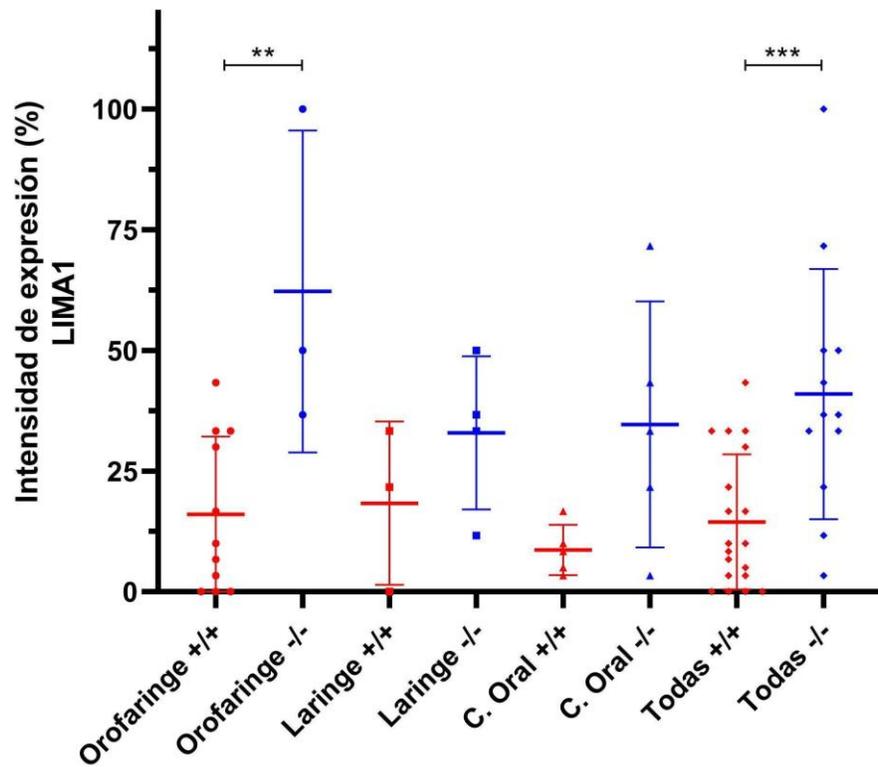
Sobreexpresión de LIMA1 en cáncer de cabeza y cuello negativo a el Virus del Papiloma Humano.

El microarreglo de LIMA1 contó con 31 muestras. Se encontró que existe una diferencia de expresión en los pacientes HNSCC, siendo mayor en aquellos pacientes VPH-/p16-; además, de manera independiente se sobreexpresa en el cáncer de Orofaringe (Figura 10, gráfica 3).

Figura 10. Expresión proteica de LIMA1 en cáncer de cabeza y cuello.



(A) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de orofaringe VPH+/p16+ (HN 248, 33%); (B) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de orofaringe VPH-/p16- (HN 251, 100%).

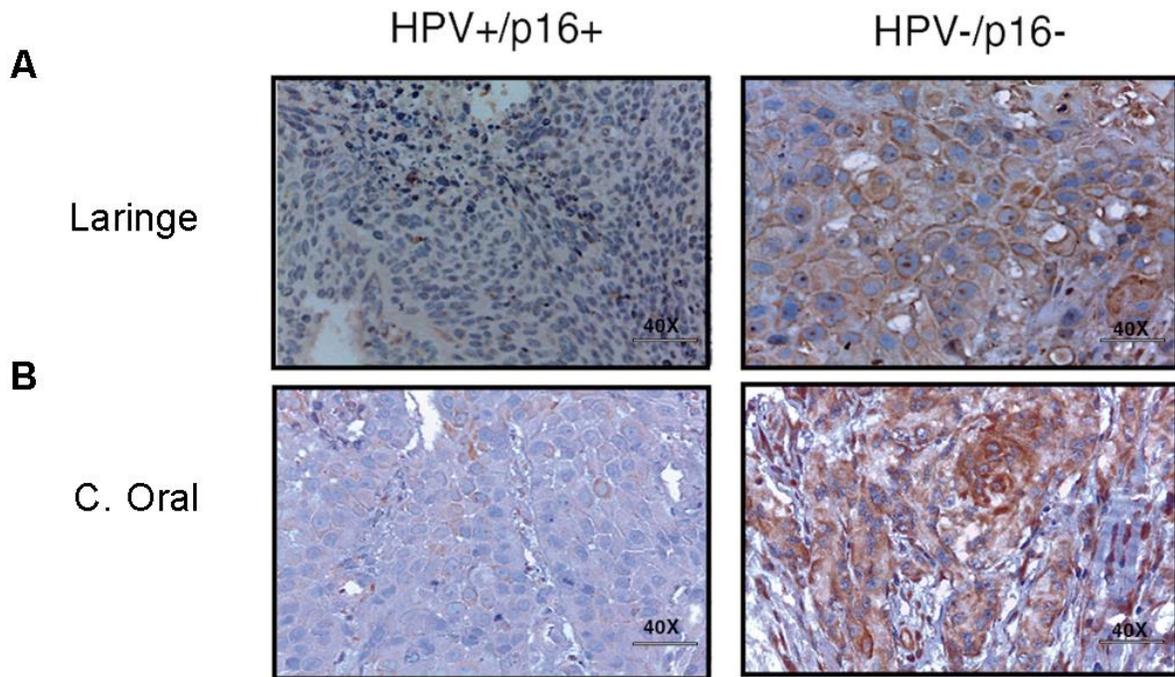


Gráfica 3. Gráfica de expresión proteica de LIMA1 en tejidos VPH+/p16+ y VPH-/p16-. El color rojo corresponde a las muestras dobles positivas y el color azul a las muestras dobles negativas. **= $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

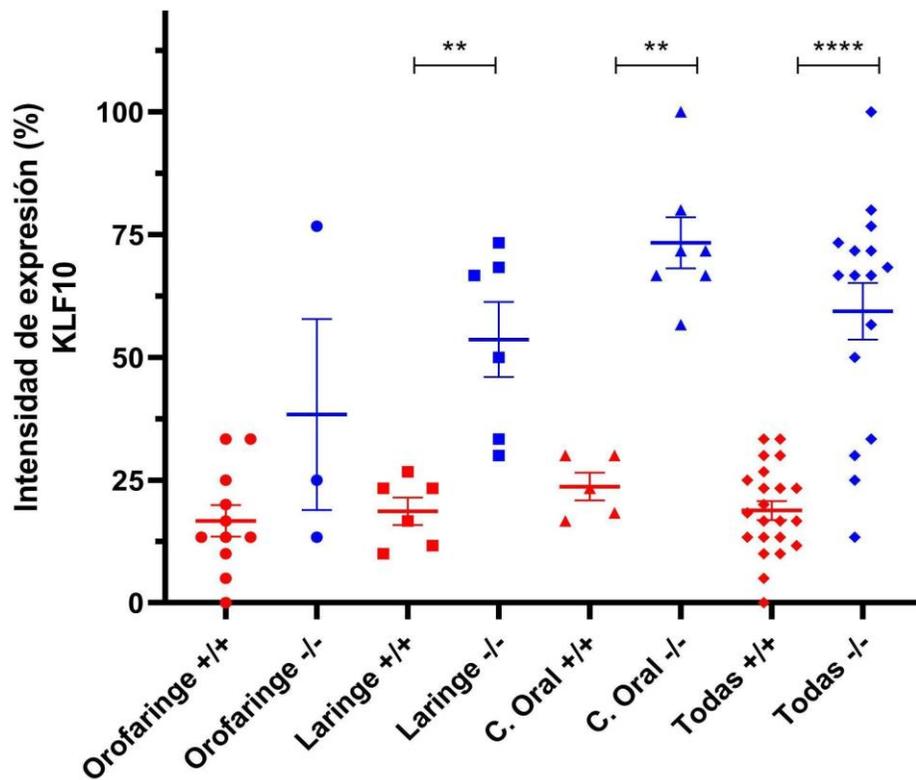
Sobreexpresión de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello negativo a el Virus del Papiloma Humano.

El portaobjetos de KLF10 contó con 38 muestras. El análisis estadístico mostró que la proteína se sobreexpresa en pacientes HNSCC VPH- en comparación con los VPH+, particularmente en cáncer de Laringe y de Cavidad Oral (Figura 11, Gráfica 4).

Figura 11. Expresión proteica de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello.

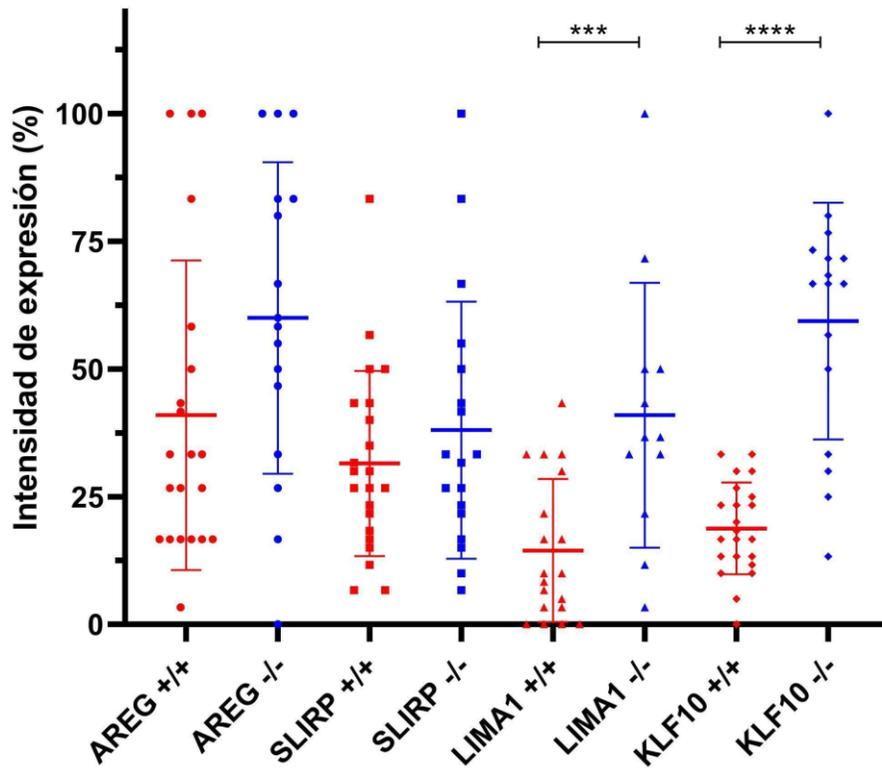


(A) Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de laringe VPH+ (HN 327, 16%) contra VPH- (HN 219, 68%); (B). Ejemplo de la intensidad de expresión en cáncer de cavidad oral VPH+ (HN 469, 30%) contra VPH- (HN 275, 66%).



Gráfica 4. Gráfica de expresión proteica de KLF10 en tejidos VPH+/p16+ y VPH-/p16-. El color rojo corresponde a las muestras dobles positivas y el color azul a las muestras dobles negativas. **= $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

La Gráfica 5 resume la expresión de las proteínas evaluadas en el microarreglo; se observa que LIMA 1 y KLF10 se encuentran sobreexpresadas en pacientes VPH negativos, en comparación con los VPH positivos. Con respecto a la expresión AREG y SLIRP, no se encontró diferencia global; sin embargo, SLIRP se sobreexpresa en pacientes VPH negativos con cáncer de cavidad oral.



Gráfica 5. Expresión proteica de AREG, SLIRP, LIMA1 y KLF10 en cáncer de cabeza y cuello VPH+/p16+ y VPH-/p16-. El color rojo corresponde a las muestras dobles positivas y el color azul a las muestras dobles negativas. ***= $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Discusión de resultados.

El cáncer de cabeza y cuello comprende a un grupo de tumores que se originan en el epitelio del área aerodigestiva superior que es causado principalmente por el consumo de tabaco, alcohol y la infección persistente del VPH (Johnson *et al.*, 2020; León *et al.*, 2023). Siendo la infección por VPH lo que lo convierte en un tipo de cáncer distinto a aquellos HNSCC VPH negativos, con características moleculares únicas y mejores pronósticos de supervivencia (Fakhry *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2023). En México, los estudios de HNSCC son escasos y en su mayoría solo abordan la presencia de ADN viral del VPH, dejando de lado la caracterización de la expresión génica (Peralta *et al.*, 2018; Garza-Ramos *et al.*, 2020; Pérez-Islas *et al.*, 2022). El presente estudio demuestra

la diferencia de expresión de las proteínas de AREG, LIMA1, SLIRP y KLF10 que existe entre los cánceres de cabeza y cuellos positivos y negativos para el virus del papiloma humano, colaborando con la validación de algunos de los genes reportados previamente en el Laboratorio de Oncología Molecular (Méndez-Matías *et al.*, 2021).

AREG es un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), AREG, al unirse a EGFR induce cascadas de señalización intracelular que son clave para el control de la supervivencia, proliferación y motilidad celular (Berasain y Ávila, 2014) y se asocia a diversos tipos de cáncer, como en el cáncer de mama, ovario y pulmón, debido a su papel en la tumorigénesis (Busser *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2013; Bolitho *et al.*, 2021). En este trabajo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión proteica de AREG, aunque se observó una tendencia de mayor expresión en los casos VPH-/p16-. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que existe una sobreexpresión de ARNm de AREG en aquellos pacientes con HNSCC que tuvieron menor supervivencia, en comparación con los grupos de pacientes con baja expresión (Tinhofer *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2021) lo que podría sugerir su uso como biomarcador pronóstico. Como ya ha sido reportado previamente, la presencia de VPH repercute en la expresión de diversos genes; Tian *et al.* en 2021, analizaron la expresión de genes basándose en las bases de datos Gene Expression Omnibus (GEO) y TCGA para la identificación de biomarcadores para HNSCC positivos y negativos a VPH; reportaron que genes como AREG, STAG3, C19orf57 y CAV1 se encontraron implicados con la supervivencia general. De manera particular, la sobreexpresión de AREG se encontró en pacientes VPH negativos, los cuales presentaron una peor supervivencia, en comparación con el grupo VPH positivo que tuvo una expresión menor y mejor supervivencia (Tian *et al.*, 2021). Es importante mencionar el número limitado de muestras de orofaringe VPH-/p16-, por lo que sería importante incrementar el número de muestras a analizar en trabajos futuros para fortalecer los hallazgos hasta ahora encontrados.

SLIRP se expresa ampliamente en tejidos humanos y cancerosos; fue identificada como una proteína de unión a una secuencia activadora de ARN de un receptor de esteroides

específico (SRA), actuando como un represor de la señal del receptor nuclear. Los análisis mostraron que SLIRP se encuentra sobreexpresada en pacientes con cáncer de cavidad oral VPH negativo; sin embargo, su función en el cáncer no se ha investigado profundamente, pese a haber reportado su expresión en cánceres de mama, próstata y pulmón (Hetchell *et al.*, 2006) y sólo se han llevado a cabo investigaciones que caracterizan la función mitocondrial de SLIRP que pueden relacionarse con su función en el cáncer al interactuar con otras proteínas. Ejemplo de ello es la interacción de SLIRP con Bcl-2 y LRPPRC, que al unirse pueden formar heterotrímeros y promover sinérgicamente su estabilización y regular la expresión y función de genes mitocondriales (Zhang *et al.*, 2020). LRPPRC es una proteína que contiene motivo PPR (repetición pentatricopeptídica) rica en leucina que regula diferentes procesos biológicos, incluido el metabolismo energético, la maduración y exportación de ARNm nuclear. Varios estudios han demostrado que la expresión de LRPPRC aumenta en tejidos cancerosos, incluidos el cáncer de próstata, pulmón, mama y esófago (Tian *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014; Fahrman *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017) en contraste con los tejidos normales que expresan bajas cantidades. La sobreexpresión LRPPRC se asocia con un mal pronóstico para la supervivencia general (Jiang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Por otra parte, la familia de proteínas Bcl-2 controla los mecanismos de muerte celular por medio de la regulación permeable de la membrana externa mitocondrial, lo que conduce a la liberación irreversible de proteínas del espacio intermembranal con activación final de caspasas y la apoptosis (Kale *et al.*, 2018). Debido a su función, Bcl-2 frecuentemente se expresa en neoplasias hematológicas inhibiendo la apoptosis (Johnson *et al.*, 2009), con respecto a los tumores sólidos, se ha encontrado a Bcl-2 en cáncer de mama, en dónde se le relaciona como un biomarcador favorable para la supervivencia (Dawson *et al.*, 2010); y líneas celulares de cáncer de pulmón, en el que ha sido un objetivo terapéutico, ya que es sensible al medicamento inhibidor de Bcl-2 Venetoclax (Lochmann *et al.*, 2018). En nuestro estudio, identificamos diferencias significativas de expresión en carcinomas de cavidad oral, por lo que es necesario profundizar en el papel de SLIRP en este sitio en particular, en el contexto del heterotrímero que regula la función de genes mitocondriales.

El análisis realizado muestra que la proteína LIMA1 se encuentra sobreexpresada de manera global en HNSCC VPH negativo, particularmente en el cáncer de orofaringe VPH negativo; es una proteína que está implicada en el control de los filamentos de actina y la adhesión celular (Raymond et al., 2003; Abe y Takeichi, 2008) y se ha encontrado en diversos tipos de cáncer, como en el cáncer de mama, próstata y ovario (Jiang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016) en los que su baja expresión se ha relacionado con un mal pronóstico para la supervivencia. Sin embargo, en el caso particular del cáncer de cabeza y cuello su sobreexpresión tiene efectos adversos, siendo un indicador de un mal pronóstico para la supervivencia. Recientemente Huang *et al.*, 2022 describieron el papel de LIMA1 en HNSCC; realizaron análisis bioinformáticos con base en datos de la TCGA y encontraron que la sobreexpresión de LIMA1 en pacientes con HNSCC promueve la adhesión celular e inhibe los efectos relacionados con la función inmune, lo que a su vez promueve la proliferación, migración y metástasis, repercutiendo en un peor pronóstico para la supervivencia (Huang *et al.*, 2022). En otro estudio realizado por Ma *et al.*, en el mismo año, abordaron la función de LIMA1 en HNSCC tomando en cuenta el estado de VPH, la investigación se basó en análisis bioinformáticos con datos de la TCGA seguido de experimentos *in vitro*; los resultados reportados fueron similares al estudio anterior, sin embargo, encontraron que LIMA1 se expresa mayormente en pacientes HNSCC VPH negativos, en comparación con los VPH positivos que presentaron una supervivencia más prolongada (Ma *et al.*, 2022). Estas investigaciones, junto con lo reportado en este trabajo, sugieren la función de LIMA1 como biomarcador pronóstico para el cáncer de cabeza y cuello, y que tanto la expresión del transcrito como de la proteína se asocian a HNSCC VPH- con mal pronóstico.

En este estudio, la proteína de KLF10 fue la que mostró más diferencia de expresión entre los HNSCC positivos y negativos para VPH, siendo mayor en los pacientes VPH negativos, tanto de manera global, como en la mayoría de sitios anatómicos. Cabe resaltar que en muestras de orofaringe se encontró una tendencia de mayor expresión en los casos HPV negativos; sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al bajo número de muestras (3 HPV-/p16- vs 11 HPV+/p16+).

KLF10 actúa como un activador o inhibidor de múltiples procesos biológicos, incluidos la proliferación, diferenciación y apoptosis (Subramaniam *et al.*, 2010; Memon y Lee, 2018; Luo *et al.*, 2022); y su expresión en diferentes tipos de cáncer se asocia con una mejor supervivencia, ya que se ha demostrado que promueve la apoptosis y favorece la inhibición de la proliferación celular (Reinholz *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2020; Shu-Ling *et al.*, 2021). Sin embargo, la sobreexpresión de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello VPH negativo podría indicar un resultado contradictorio al predecir resultados desfavorables en la supervivencia, como en el cáncer de pulmón (Uhlen *et al.*, 2017). Además, la investigación de Chang *et al* en 2010, demostró que la oncoproteína E7 del VPH 16 interactúa con KLF10 y reduce su expresión por medio de la ubiquitinación, esto en modelos *in vitro* de líneas celulares de cáncer cervicouterino VPH positivas (Chang *et al.*, 2010) lo que podría explicar el por qué KLF10 no se encuentra sobreexpresado en pacientes VPH positivos. Por otro lado, en varias células cancerosas, la vía de señalización TGF- β es funcional, por lo que las células tumorales podrían utilizar el TGF- β como un factor de progresión tumoral, actuando como supresor de tumores en las primeras etapas de la carcinogénesis, pero promoviendo la progresión del tumor en las últimas etapas de la misma al modificar el ambiente tumoral después de su sobreexpresión (Dumont y Arteaga, 2002; Pardali y Moustakas, 2007). Hasta el momento, la única investigación que relaciona la sobreexpresión de KLF10 en HNSCC VPH negativo con un pronóstico desfavorable es la realizada en el Laboratorio de Oncología Molecular (Méndez-Matías *et al.*, 2021) por lo que el desarrollo de futuras investigaciones que profundicen en la función de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello son necesarias para comprender su papel en este tipo de cáncer.

Conclusiones.

En el presente estudio se evaluó la expresión a nivel de proteína de los transcritos relacionados con la supervivencia descritos previamente; se identificó una mayor expresión proteica de SLIRP, LIMA1 y KLF10 en muestras de pacientes con cáncer de cabeza y cuello VPH negativo en comparación con los VPH positivo, sin embargo, es importante mencionar que a pesar de no haberse encontrado diferencias estadísticas en la expresión de AREG en muestras VPH positivas y negativas, es posible observar una

tendencia de mayor expresión en las muestras VPH-/p16-, misma que ha sido identificada a nivel de transcrito por otras investigaciones, por lo tanto, existe evidencia suficiente como para sugerir su uso como biomarcador pronóstico.

Hasta el momento, la única proteína cuya expresión puede estar relacionada de manera directa con VPH es KLF10 a través de la oncoproteína E7, por lo que es necesario llevar a cabo más investigaciones al respecto, siendo lo descrito en este trabajo la primera evidencia sobre la expresión diferencial de KLF10 en cáncer de cabeza y cuello VPH positivo y negativo.

Por último, debido a que los HNSCC VPH negativo presentan una supervivencia más corta en comparación con los VPH positivo, se sugiere que estos transcritos están relacionadas con la progresión del HNSCC y su uso como biomarcador podría contribuir a la estratificación de los pacientes con mal pronóstico.

Referencias.

Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer. (2023). List of classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, IARC Monographs Volumes 1-134. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Recuperado en octubre, 2023, de <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>

Abe, K. y Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin–catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 13-19.

Bartel, D. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 166(1), 281-297.

Baughman, J., Nilsson, R., Gohil, V., Arlow, D., Gauhar, Z. y Mootha, V., A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *Plos Genetics*, 5(8), e1000590.

Berasain, C., y Avila, M. A. (2014). Amphiregulin. *Seminars in cell & developmental biology*, 28(1), 31–41.

Bigagli, E., Locatello, L., Stadio, A., Maggiore, G., Valdarnini, F., Bambi, F., Gallo, O. y Lucero, C. (2021). Extracellular vesicles miR-210 as a potential biomarker for diagnosis and survival prediction of oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 51(4), 350-357.

Bolitho, C., Moscova, M., Baxter, R. C., y Marsh, D. J. (2021). Amphiregulin increases migration and proliferation of epithelial ovarian cancer cells by inducing its own expression via PI3-kinase signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 533, 111338.

Bratman, S., Bruce, J. O'Sullivan, B., Pugh, T., Xu, W., Yip, K. y Liu, F. (2016). Human Papillomavirus Genotype Association With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol*, 2(6), 823-826.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Soerjomataram, I. y Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74(3), 229-263.

Burtneß, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., Psyrrí, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fueeder, T., Hughes, B., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W., Hong, R., González, R., Roy, A., ... Rischin, D. (2019). Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 394(10212), 1915–1928.

Busser, B., Coll, J. y Hurbin, A. (2009). The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. *Pathologie Biologie*, 57(7-8), 511-512.

Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J. y Hurbin, A. (2011). The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816(2), 119-131.

Cárcamo, M. (2018). Epidemiología y generalidades del tumor de cabeza y cuello. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(4), 388-396.

Caburet, S., Anttonen, M., Todeschini, A., Unkila-Kallio, L., Mestivier, D., Butzow, R. y Veitia, R. (2015). Combined comparative genomic hybridization and transcriptomic analyses of ovarian granulosa cell tumors point to novel candidate driver genes. *BMC Cancer*, 15(251).

Chandel, V., Raj, S., Kumar, P., Gupta, S., Dhasmana, A., Kavindra, K., Ruokolainen, J., Mehra, P., Das, B., Kamal, M. y Kumar, D. (2020). Metabolic regulation in HPV associated head and neck squamous cell carcinoma. *Life Sciences*, 258(1), 118236.

Chang, D., Park, N., Denny, C., Nelson, S. y Pe, M. (1998). Characterization of transformation related genes in oral cancer cells. *Oncogene*, 16(1), 1921-1930.

Chang, H-S., Lin, C-H., Yang, C-H., Liang, Y-J. y Yu, W. (2010). The human papillomavirus-16 (HPV-16) oncoprotein E7 conjugates with and mediates the role of the transforming growth factor-beta inducible early gene 1 (TIEG1) in apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(11), 1831-1839.

Chang, P-H., Wang, H.-M., Kuo, Y.-C., Lee, L.-Y., Liao, C.-J., Kuo, H.-C., Hsu, C.-L., Liao, C.-T., Lin, S. H.-C., Huang, P.-W., Wu, T. M.-H., & Hsieh, J. C.-H. (2021). Circulating p16-Positive and p16-Negative Tumor Cells Serve as Independent Prognostic Indicators of Survival in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Journal of Personalized Medicine*, 11(11), 1156.

Chang, V., Chu, P., Peng, S., Mao, T., Shan, Y., Hsu, C., Lin, C., Tsai, K., Yu, W. y Ch'ang, H. (2012). Krüppel-Like Factor 10 Expression as a Prognostic Indicator for Pancreatic Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 181(2), 423-430.

Chen, F., Xu, B., Li, J., Yang, X., Gu, J., Yao, x. Y Xinchun, S. (2021). Hypoxic tumour cell-derived exosomal miR-340-5p promotes radioresistance of oesophageal squamous cell carcinoma via KLF10. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 40(1) , 38.

Chera, B. S., Amdur, R. J., Green, R., Shen, C., Gupta, G., Tan, X., Knowles, M., Fried, D., Hayes, N., Weiss, J., Grilley-Olson, J., Patel, S., Zanation, A., Hackman, T., Zevallos, J., Blumberg, J., Patel, S., Kasibhatla, M., Sheets, N., Weissler, M., ... Mendenhall, W. (2019). Phase II Trial of De-Intensified Chemoradiotherapy for Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 37(29), 2661–2669.

Childs, G., Fazzari, M., Kung, G., Kawachi, N., Brandwein-Gensler, M., McLemore, M., Chen, Q., Burk, R., Smith, R., Prystowsky, M., Belbin, T. y Schlecht, N. (2009). Low-Level Expression of MicroRNAs let-7d and miR-205 Are Prognostic Markers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 174(3), 736-745.

Concha, M. (2007). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Infectología Práctica*, 24(3), 209-214

Contreras, W. y Venegas, B. (2015). Human Papilloma virus in Oral and Oropharyngeal Cancer. Review of the Literature. *In. J. Odontostomat*, 9(3), 427-435.

Cozma, E., Banciu, L., Celarel, A., Soare, E., Srichawla, B., Kipkorir, V. y Găman, M. (2024). Molecular mechanisms of human papilloma virus related skin cancers: A review. *Medicine*, 103(21), p e38202.

Dawson, S., Makretsov, N., Blows, F., Driver, K., Provenzano, E., Quesne, J., Baglietto, L., Severi, G., Giles, G., McLean, C., Callagy, G., Green, A., Ellis, I., Gelmon, K., Turashvili, G., Leung, S., Aparicio, S., Huntsman, D. y Caldas, C. (2010). BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*, 103(1), 668-675.

Dumont, N., y Arteaga, C. L. (2002). The tumor microenvironment: a potential arbitrator of the tumor suppressive and promoting actions of TGFbeta. *Differentiation; research in biological diversity*, 70(9-10), 574–582.

Edge, S. (Eds). (2010). AJCC cancer staging manual. Springer

Fahrman, J., Grapov, D., Phinney, B., Stroble, C., De Felice, B., Rom, G., Gándara, D., Zhang, Y., Fiehn, O., Harvey, P. y Miyamoto, S. (2016). Proteomic profiling of lung adenocarcinoma indicates heightened DNA repair, antioxidant mechanisms and identifies LASP1 as a potential negative predictor of survival. *Clinical Proteomics*, 13(31), 1-12.

Fang, L., Sun, Y. P., y Cheng, J. C. (2023). The role of amphiregulin in ovarian function and disease. *Cellular and molecular life sciences*, 80(3), 60.

Fakhry, C., Westra, W., Wang, S., Zante, A., Zhang, Y., Rettig, E., Yin, L., Ryan, W., Ha, P., Wentz, A., Koch, W., Richmon, J.D., Eisele, D.W. y D'Souza, G. (2017). The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*, 123(9), 1566-1575.

Ferris, L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E., Even, C., Worden, F., Saba, N., Iglesias L., Haddad, D. Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., ... Gillison, M. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1856-1867.

Ferris, R. L., Flament, Y., Weinstein, G. S., Li, S., Quon, H., Mehra, R., Garcia, J. J., Chung, C. H., Gillison, M. L., Duvvuri, U., O'Malley, B. W., Jr, Ozer, E., Thomas, G. R., Koch, W. M., Gross, N. D., Bell, R. B., Saba, N. F., Lango, M., Méndez, E., y Burtness, B. (2022). Phase II Randomized Trial of Transoral Surgery and Low-Dose Intensity Modulated Radiation Therapy in Resectable p16+ Locally Advanced Oropharynx Cancer: An ECOG-ACRIN Cancer Research Group Trial (E3311). *Journal of clinical oncology*, 40(2), 138–149. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01752>

Freedman, N., Park, Y., Subar, A., Hollenbeck, A., Leitzmann, M., Schatzkin, A. y Abnet, C. (2007). Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 122(10), 2330-2336.

Gallegos-Hernández, J. (2015). Cáncer de cabeza y cuello. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), 1-2.

Gallegos-Hernández, J. (2020). Cáncer de cabeza y cuello, su impacto en la historia de la humanidad. *Gaceta Médica Mexicana*, 156(2), 104-109.

Gao, J., Ulekriv, C. y Halstensen, T. (2016). Epidermal growth factor (EGF) receptor-ligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF- induced amphiregulin expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(151).

Garza-Ramos, M., Urrutia-Baca, V., Urbina-Rios, C., García-Robayo D., Tamez-Guerra, P. y Gómez-Flores, R. (2020). Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity of an indigenous community from Southwest México. *Infectio, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 83(1), 104283.

Gee, H., Camps, C., Buffa, F., Patiar, S., Invierno, S., Betts, G., Homer, J., Corbridge, R., Cox, G., West, C., Ragoussis, J. y Harris, A. (2010). hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer*, 116(9), 2148-2158.

Gillison, M. L. D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S. y Viscidi, R. (2008). Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16–Positive and Human Papillomavirus Type 16–Negative Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(6), 407-420.

Gillison, M. L., Trotti, A. M., Harris, J., Eisbruch, A., Harari, P. M., Adelstein, D. J., Jordan, R. C. K., Zhao, W., Sturgis, E. M., Burtneess, B., Ridge, J. A., Ringash, J., Galvin, J., Yao, M., Koyfman, S. A., Blakaj, D. M., Razaq, M. A., Colevas, A. D., Beitler, J., ... Q. (2019). Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin for human papillomavirus (HPV)-positive oropharyngeal cancer: a randomized, multicenter, non-inferiority clinical trial. *Lancet*, 393(10166), 40–50.

Gutiérrez-Aguilar, R.; Benmezroua, Y.; Balkau, B.; Marre, M.; Helbecque, N.; Charpentier, G.; Polychronakos, C.; Sladek, R.; Froguel, P. y Neve, B. (2007). Minor contribution of SMAD7 and KLF10 variants to genetic susceptibility of type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 33(1), 372–378.

Guha, N., Boffetta, P., Filho, V., Neto, J., Shangina, X., Zaridze, D., Curado, M., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Fernández, L. Mates, D., Daudt, A., Lissowska, J., Dikshit, R. y Brennan, P. (2007). Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology*, 166(10), 1159-1173.

Guo, M., Zhang, L., Wang, H., Zhou, Q., Zhu, X., Fu, X., Yang, J., Liu, S., Guo, D., & Zhang, B. (2023). SOCS1 as a Biomarker Candidate for HPV Infection and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(7), 5598–5612.

Hachim, M., Elemam, N., Ramakrishnan, R., Salameh, L., Olivenstein, R., Hachim, I. Y., Venkatachalam, T., Mahboub, B., Al Heialy, S., Halwani, R., Hamid, Q., y Hamoudi, R. (2020). Blood and Salivary Amphiregulin Levels as Biomarkers for Asthma. *Frontiers in medicine*, 7(1), 561866.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12 (1), 31-46.

Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, P., Maso, L., Daudt, A., Fabianova, E., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R., Herrero, R., Koifman, S., Vecchia, S., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., ... Boffetta, P. (2007). Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute.*, 99(10), 777-789.

Hatchell, E. C., Colley, S. M., Beveridge, D. J., Epis, M. R., Stuart, L. M., Giles, K. M., Redfern, A. D., Miles, L. E., Barker, A., MacDonald, L. M., Arthur, P. G., Lui, J. C., Golding, J. L., McCulloch, R. K., Metcalf, C. B., Wilce, J. A., Wilce, M. C., Lanz, R. B., O'Malley, B. W., y Leedman, P. J. (2006). SLIRP, a small SRA binding protein, is a nuclear receptor corepressor. *Molecular cell*, 22(5), 657–668.

Head and Neck Cancer Alliance. (2017). Staging system for HPV throat cancer. Recuperado en Noviembre 2023, de <https://www.headandneck.org/hpvthroatcancerstaging/>

Huang, H., Du, Y., Zhao, D. y Chen, K. (2022). The Relationship between the Prognostic Marker LIMA1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Immune Infiltration. *Journal of Oncology*, 2022(1), 1040116.

Hui, A., Lin, A., Xu, W., Waldron, L., Perez-Ordóñez, B., Weinreb, I., Shi, W., Bruce, J., Huang, S., O'Sullivan, B., Waldron, J., Gullane, P., Irish, J., Chan, K. y Liu, F. (2013). Potentially Prognostic miRNAs in HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(8). 2154-2162.

International Human Papillomavirus Reference Center. (2023). HPV Reference clones. Recuperado en noviembre, 2023 de <https://www.hpvcenter.se>

Jeong, B. Y., Cho, K. H., Jeong, K. J., Cho, S. J., Won, M., Kim, S. H., Cho, N. H., Hur, G. M., Yoon, S. H., Park, H. W., Mills, G. B., y Lee, H. Y. (2022). Lysophosphatidic acid-induced amphiregulin secretion by cancer-associated fibroblasts augments cancer cell invasion. *Cancer letters*, 551 (1), 215946.

Jiang, X., Li, X., Huang, H., Jiang, F., Lin, Z., He, H., Chen, Y., Yue, F., Zou, J., He, Y., Wang, W., Yang, W., Zhao, H., Lai, Y., Wang, F., Zhong, W. y Liu, L. (2014). Elevated levels of mitochondrion-associated autophagy inhibitor LRPPRC are associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer*, 120(8), 1228-1236.

Jiang, W., Martín, T., Lewis-Russel, J., Douglas-Jones, A., Ye, L. y Mansel, R. (2008). Eplin-alpha expression in human breast cancer, the impact on cellular migration and clinical outcome. *Molecular Cancer*, 7(71).

Jim, H. S., Lin, H. Y., Tyrer, J. P., Lawrenson, K., Dennis, J., Chornokur, G., Chen, Z., Chen, A. Y., Permuth-Wey, J., Aben, K. K., Anton-Culver, H., Antonenkova, N., Bruinsma, F., Bandera, E. V., Bean, Y. T., Beckmann, M. W., Bisogna, M., Bjorge, L., Bogdanova, N., Brinton, L. A., ... Phelan, C. M. (2015). Common Genetic Variation in Circadian

Rhythm Genes and Risk of Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *Journal of genetics and genome research*, 2(2), 17.

Jin, W., Chen, B., Li, J., Zhu, H., Huang, M., Gu, S., Wang, Q., Chen, J., Yu, J., y Saho, Z. (2012). TIEG1 Inhibits Breast Cancer Invasion and Metastasis by Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Transcription and the EGFR Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 50-63.

Johnson, D., Burtneess, B., Leemans, C., Yan, V., Bauman, E. y Grandis, J. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 6(92), 1-22.

Kale, J., Osterlund, E. y Andrews, D. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death & differentiation*, 25(1), 65-80.

Kennedy-Crispin, M., Billick, E., Mitsui, H., Gulati, N., Fujita, H., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Johnson-Huang, L., Suárez-Fariñas, M. y Krueger, J. (2012). Human keratinocytes' response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(1), 105-113.

Kim, J.K.; Lee, K.S.; Chang, H.Y.; Lee, W.K. y Lee, J.I. (2014). Progression of diet induced nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by increased expression of Kruppel-like-factor 10 in mice. *J. Transl. Med*, 12, 186.

Kimple, R., Smith, M., Blitzer, G., Torres, A., Martín, J., Yang, R., Peet, C., Lorenz, L., Nickel, K., Klingelhutz, A., Lambert, P. y Harari, P. (2013). Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Research*, 73(15), 4791-4800.

Kuhn, J., Schmid, W., Korner, S., Bochen, F., Wemmert, S., Rimbach, H., Smola, S., Radosa, J., Wagner, M., Morris, L., Bozzato, V., Bozzato, A., Schick, B. y Linxweiler, M. (2021). HPV Status as Prognostic Biomarker in Head and Neck Cancer—Which Method Fits the Best for Outcome Prediction?. *Cancers*, 13(18), 4730.

Lagunas, F. A. (2018). Virus y cáncer. *Ciencia*, 69(2), i1-i6.

Lagouge, M., Mourier, A., Lee, H., Spahr, H., Wai, T., Kukat, C., Silva, E., Motori, E., Bush, J. y Siira, S. (2015). SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation. *Plos genetics*, 11(8), e1005423.

Leal, Y. A., Torres, J., Gamboa, R., Mantilla-Morales, A., Piña-Sanchez, P., Arrieta, O., Bonifaz, L., Meneses, A., Duque, C., & Piñeros, M. (2022). Cancer Incidence in Merida, Mexico 2015-2018: First Report from the Population-based Cancer Registry. *Archives of medical research*, 53(8), 859–866.

León, X., Pujals, G., Sauter, B., Neumann, E., Pujol, A. y Quer, M. (2023). Differential characteristics of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck with no history of tobacco or alcohol use. *Acta Otorrinolaringológica (English edition)*, 74(1), 31-38.

Li, L., Wang, X., Lei, Q., Sun, C., Xi, Y., Chen, R. y He, Y. (2020). Comprehensive immunogenomic landscape analysis of prognosis-related genes in head and neck cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 6395.

Ling, J., Chang, A., Ye, H., Zhao, H. y Zhou, X. (2021). TXNIP, CXCL1, and AREG as key genes in formaldehyde-induced head and neck carcinoma: an in silico analysis. *Inhalation Toxicology*, 33(3), 113-120.

Liu, R., Martín, T., Jordan, N., Ruge, F., Ye, L. y Jiang, W. (2016). Epithelial protein lost in neoplasm- α (EPLIN- α) is a potential prognostic marker for the progression of epithelial ovarian cancer. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2488-2496.

Liu, Y., Sanders, A., Zhang, L. y Jiang, W. (2012). EPLIN- α expression in human oesophageal cancer and its impact on cellular aggressiveness and clinical outcome. *Anticancer Research*, 32(4), 1283-1289.

Lochmann, T., Floros, K., Naseri, M., Powell, K., Cook, W., March, R., Stein, G., Greninger, P., Maves, Y., Saunders, L., Dylla, S., Costa, C., Boikos, S., Levenson, J., Souer, A., Krystal, G. y Harada, H. (2018). Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical Cancer Research*, 24(2), 360-369.

Luo, H., Zhu, J., Chen, M., Mu, W. y Guo, L. (2022). Krüppel-like factor 10 (KLF10) as a critical signaling mediator: Versatile functions in physiological and pathophysiological processes. *Genes & diseases*, 10(3), 915–930.

Lydiatt, W., Patel, S., O'Sullivan, B., Brandwein, M., Ridge, J., Migliacci, J., Loomis, A. y Shas, J. (2017). Head and Neck Cancers-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *Cancer Journal for Clinicians*, 26(2), 122-137.

Ma, W., Liao, Y., Gao, Z., Zhu, W., Liu, J. y She, W. (2022). Overexpression of LIMA1 Indicates Poor Prognosis and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Medicine Insights Oncology*, 16(1).

Marwan, A., Rojas, M., Michelli, J. y Celaya, J. (2015). Evaluación de la expresión de marcadores celulares p16 INK4a, PCNA y Cadherina E, mediante técnicas inmunohistoquímicas en lesiones de cuello uterino causadas por virus del papiloma humano. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 46(1-2), 51-67.

Mateos, M. L., Pérez-Castro, S., Pérez-García, M. T. y Rodríguez-Iglesias, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. En Carcenado, E. y Cantón, R. (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (6-24).

España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Harry, I., McConkey, C., Paleri, V. y Roberts, S. (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and non oropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time region. *Head & neck*, 35(5), 747–755.

Memon, A. y Lee, W. (2018). KLF10 as a Tumor Suppressor Gene and Its TGF- β Signaling. *Cancers*, 10(6), 161.

Méndez-Matías, G., Velázquez-Velázquez, C., Castro-Oropeza, R., Mantilla-Morales, A., Ocampo-Sandoval, D., Burgos-González, A., Heredia-Gutiérrez, C., Alvarado-Cabrero, I., Sánchez-Sandoval, R., Barco-Bazán, A., Chilaca-Rosas, F., y Piña-Sánchez, P. (2021). Prevalence of HPV in Mexican Patients with Head and Neck Squamous Carcinoma and Identification of Potential Prognostic Biomarkers. *Cancers*, 13(22), 5602.

Michaud, D., Langevin, S., Eliot, M., Nelson, H., Pawlita, M., McClean, M. y Kelsey, K. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 135(7), 1653-1661.

Minchado, D., Oleas, L. y Bigoni, G. (2020). Prevalencia de los Genotipos del Virus del Papiloma Humano en mujeres de 25 a 65 años. *Oncología*, 30(1), 39-52.

Mishra, V. K., Subramaniam, M., Kari, V., Pitel, K. S., Baumgart, S. J., Naylor, R. M., Nagarajan, S., Wegwitz, F., Ellenrieder, V., Hawse, J. R., & Johnsen, S. A. (2017). Krüppel-like Transcription Factor KLF10 Suppresses TGF β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition via a Negative Feedback Mechanism. *Cancer research*, 77(9), 2387–2400.

Munger, K., Gwin, T. y McLaughlin-Drubin, M. (2013). p16 in HPV-associated cancers. *Oncotarget*, 4(11). 1864-1865.

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J., e International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*, 348(6), 518–527.

Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsagué, X., Laporte, L., Bosch, F., Sanjosé, S. y Trottier, H. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16^{INK4a} detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 15(12), 319-331.

Organización Mundial de la Salud. (2022). Cáncer. Recuperado en octubre 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Pardali, K., y Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1775(1), 21–62

Partin, J.V.; Anglin, I.E.; Kyprianou, N. (2003). Quinazoline-based alpha 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via TGF-beta signaling and I kappa B alpha induction. *Br. J. Cancer*, 88(1), 1615–1621

Partlová, S., Boucek, J., Kloudová, K., Lukesová, E., Zábrodsky, M., Grega, M., Fuciková, J., Truxová, I. Tachezy, R., Spísek, R. y Fialová, A. (2015). Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology*, 4(1).

Papadakis, K.A.; Krempsi, J.; Svingen, P.; Xiong, Y.; Sarmiento, O.F.; Lomberk, G.A.; Urrutia, R.A. y Faubion, W.A. (2015). Kruppel-like factor KLF10 deficiency predisposes

to colitis through colonic macrophage dysregulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 309(11), G900–G909.

Peralta, R., Garcia, P., Valdivia, A., Lopez, A., Apresa, T., Hernandez, D., Gallegos, F., Alvarado-Cabrero, I., Vargas-De-Leon, C., Davila, S., Romero, P., y Salcedo, M. (2018). HPV Could be a Potential Factor of Survival in Laryngeal Cancer: a Preliminary Study in Mexican Patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 19(6), 1711–1716.

Pérez-Islas, E., García-Carrancá, A., Acosta-Gio, E., Reynoso-Noverón, N., Maldonado-Martínez, H., Guido-Jiménez, M., Sobrevilla-Moreno, N., Granados-García, M., Pérez-Báez, W., y Vilar-Compte, D. (2022). Prognostic importance of DNA from human papillomavirus in patients with oral squamous cell carcinoma. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 27(2), e150–e158.

Pokřývková, B., Šmahelová, J., Dalewska, N., Grega, M., Vencálek, O., Šmahel, M., Nunvář, J., Klozar, J., & Tachezy, R. (2021). ARG1 mRNA Level Is a Promising Prognostic Marker in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Diagnostics*, 11(4), 628

Popławski, P., Zarychta-Wiśniewska, W., Burdzińska, A., Bogusławska, J., Adamiok-Ostrowska, A., Hanusek, K., Rybicka, B., Białas, A., Kossowska, H., Iwanicka-Rokicka, R., Koblowska, M., Pączek, L., y Piekietko-Witkowska, A. (2023). Renal cancer secretome induces migration of mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy*, 14(1), 200.

Powman, G., Green, J., McDonald, L., Neubauer, M., Disteché, C., Todaro, G. y Shoyab, M. (1990). The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Molecular and Cellular Biology*, 10(5), 1969-1981.

Rajamannan, N.M.; Subramaniam, M.; Abraham, T.P.; Vasile, V.C.; Ackerman, M.J.; Monroe, D.G.; Chew, T.L. y Spelsberg, T. C. (2007). TGFbeta inducible early gene-1

(TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J. Cell. Biochem*, 100(1), 315–325.

Rautava, J. y Syrjänen, S. (2012). Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathol*, 6(1), S3-S15.

Raymond, S. y Chang, D. (1999). EPLIN, Epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene*, 18(1), 7838-7841.

Raymond, S., Amann, K., Gerbin, S., Pollard, T. y Chang, D. (2003). EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *Journal of Cell Biology*, 160(3), 399-407.

Rehmani, H. e Issaeva, N. (2020). EGFR in head and neck squamous cell carcinoma: exploring possibilities of novel drug combinations. *Annals of Translational Medicine*, 8(13), 1-4.

Reinholz, M.M.; An, M.W.; Johnsen, S.A.; Subramaniam, M.; Suman, V.J.; Ingle, J.N.; Roche, P.C. y Spelsberg, T.C. (2004). Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), SMAD7, SMAD2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast cancer research and treatment*, 86 (1), 75–88.

Robles, J., Pérez, T., Iznaga, N. y Contreras, P. (2020). Caracterización clínica del cáncer de cabeza y cuello. *Revista Cubana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 4(1), 1-12.

Sabatini, M. y Chiocca, S. (2020). Human papillomavirus as a driver of head necks cancers. *Br L Cancers*, 122(3), 306-314.

Sanders, A., Martín, T., Ye, L., Mason, M. y Jiang, W. (2011). EPLIN is a negative regulator of prostate cancer growth and invasion. *The Journal of Urology*, 186(1), 295-301.

Sato, T., Tran, T., Peck, A., Liu, C., Ertel, A., Lin, J., Neilson, L. y Rui, H. (2013). Global profiling of prolactin-modulated transcripts in breast cancer in vivo. *Molecular Cancer*, 12(59).

Schneider, M. y Lobo, E. (2008). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of Cellular Physiology*, 218(3), 460-466.

Shoyab, M., Plowman, G. D., McDonald, V. L., Bradley, J. G., y Todaro, G. J. (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4894 Pt 1), 1074–1076.

Shu-ling, P., Shan, Y., Hsia, C., Liu, T., Chen, T., Ho, C., Chou, W., Hsieh, R., Chen, L. y Ch'ang, H. (2021). High expression of krüppel-like factor 10 or Smad4 predicts clinical benefit of adjuvant chemoradiotherapy in curatively resected pancreatic adenocarcinoma: From a randomized phase III trial. *Radiotherapy & oncology*, 158(1), 146-154.

Spence, T., Bruce, J., Yip, K. y Liu, F. (2016). Associated Head and Neck Cancer. *Cancers*, 8(75), 1-12.

Specenier, P. y Vermorken, J. B. (2013). Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics: targets & therapy*, 7(1), 77–90.

Subramaniam, M., Harris, S., Oursler, M., Rasmussen, K., Riggs, B. y Spelsberg, T. (1995). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic acids research*, 23(23), 4907–4912.

Subramaniam, M.; Hawse, J. R., Johnsen, S. A. y Spelsberg, T. C. (2007). Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J. Cell. Biochem*, 102(3), 539–548.

Subramaniam, M., Hawse, J. R., Rajamannan, N., Ingle, J. y Spelsberg, T. (2010). Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *BioFactors*, 36(1), 8-18.

Sun, L., Liu, L., Fu, H., Wang, Q. y Shi, Y. (2016). Association of Decreased Expression of Serum miR-9 with Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Medial Science Monitor*, 22(1). 289-294.

Sun, Y., Khan, Md. A. A. K., Mangiola, S., & Barrow, A. D. (2023). IL17RB and IL17REL Expression Are Associated with Improved Prognosis in HPV-Infected Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Pathogens*, 12(4), 572.

Taguchi, K., Ishiuchi, T. y Takeichi, M. (2011). Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *Journal of Cell Biology*, 194(4), 643-656.

The Cancer Genome Atlas Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517 (1), 576-582.

Tian, G., Fu, Y., Zhang, D., Li, J., Zhang, Z., y Yang, X. (2021). Identification of four key prognostic genes and three potential drugs in human papillomavirus negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer cell international*, 21(1), 167.

Tian, T., Ikeda, J., Wang, Y., Mamat, S., Luo, W., Aozasa, K. y Morii, E. (2012). Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumourigenesis in cancers. *European Journal of Cancer*, 48(15), 2462-2473.

Tinhofer, I., Klinghammer, K., Weichert, W., Knödler, M., Stenzinger, A., Gauler, T., Budach, V., y Keilholz, U. (2011). Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect

outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clinical cancer research*, 17(15), 5197–5204.

Tomaszewska, W., Kozłowska-Maslon, J., Baranowski, D., Perkowska, A., Szalkowska S., Kaźmierczak, U., Severino, P., Lamperska, K. y Kolenda, T. (2021). miR-154 Influences HNSCC Development and Progression through Regulation of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Process and Could Be Used as a Potential Biomarker. *Biomedicine*, 9(12), 1894.

Trisciuglio, D., Desideri, M., Farini, V., De Luca, T., Di Martile, M., Tupone, M. G., Urbani, A., D'Aguanno, S., & Del Bufalo, D. (2016). Affinity purification-mass spectrometry analysis of bcl-2 interactome identified SLIRP as a novel interacting protein. *Cell death & disease*, 7(2), e2090.

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhorji, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnström, H., Glimelius, B., ... Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6352), eaan2507.

Wang, Z., Wang, Q., Tao, Y., Chen, J., Yuan, Z. y Wang, P. (2023). Characterization of immune microenvironment in patients with HPV-positive and negative head and neck cancer. *Scientific data*, 10(1), 694.

Ward, M., Thirdborough, S., Mellows, T., Riley, C., Harris, S., Suchak, K., Webb, A., Hampton, C., Patel, N., Randall, C., Cox, H., Jogai, S., Primrose, J., Piper, K., Ottensmeier, C., King, E. y Thomas, G. (2014). Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 110(1), 489-500.

Westra, W. (2014). Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncology*, 50(9), 771-779.

Wirth, M., Jira, D., Ott, A., Piontek, G., & Pickhard, A. (2018). High NOTCH1 mRNA Expression Is Associated with Better Survival in HNSCC. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 830.

Yang, Q. y Yan, L. Development of gene signature and nomogram for diagnosis and prognosis of oral carcinoma. *Archives of Oral Biology*, 136, 105375

Yin, H., Harrison, T. A., Thomas, S. S., Sather, C. L., Koehne, A. L., Malen, R. C., Reedy, A. M., Wurscher, M. A., Hsu, L., Phipps, A. I., Zaidi, S. H. E., Newcomb, P. A., Peters, U., y Huyghe, J. R. (2023). T cell-inflamed gene expression profile is associated with favorable disease-specific survival in non-hypermutated microsatellite-stable colorectal cancer patients. *Cancer medicine*, 12(6), 6583–6593.

Yom, S. S., Torres-Saavedra, P., Caudell, J. J., Waldron, J. N., Gillison, M. L., Xia, P., Truong, M. T., Kong, C., Jordan, R., Subramaniam, R. M., Yao, M., Chung, C. H., Geiger, J. L., Chan, J. W., O'Sullivan, B., Blakaj, D. M., Mell, L. K., Thorstad, W. L., Jones, C. U., Banerjee, R. N., ... Le, Q. T. (2021). Reduced-Dose Radiation Therapy for HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma (NRG Oncology HN002). *Journal of clinical oncology*, 39(9), 956–965.

Zaiss, D., Gause, W., Osborne, L. y Artis, D. (2015). Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. *Immunity*, 42(2), 216-226.

Zhang, H. Y., Ma, Y. D., Zhang, Y., Cui, J., y Wang, Z. (2017). Elevated levels of autophagy-related marker ULK1 and mitochondrion-associated autophagy inhibitor LRPPRC are associated with biochemical progression and overall survival after androgen

deprivation therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 70 (5), 383–389.

Zhang, Q., Cai, S., Guo, L. y Zhao, G. (2020). Propofol induces mitochondrial-associated protein LRPPRC and protects mitochondria against hypoxia in cardiac cells. *PloS One*, 15(9), e0238857.

Zhang, S., Wang, X., Osunkoya, A., Iqbal, S., Wang, Y., Chen, Z., Muller, S, Chen, Z., Josson, S., Coleman, I., Nelson, P., Wang, R., Shin, D., Marshall, F., Kucuk, O., Chung, L., Zhau, H. y Wu, D. (2011). EPLIN downregulation promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene*, 30(50), 4941-4952.

Zhang, X., Yang, L., Kong, M., Ma, J., y Wei, Y. (2021). Development of a prognostic signature of patients with esophagus adenocarcinoma by using immune-related genes. *BMC bioinformatics*, 22(1), 536.

Zheng, Y., Chi, S. y Li, C. (2020). Identification of potential gene drivers of cutaneous squamous cell carcinoma: Analysis of microarray data. *Medicine*, 99(39), e22257.

Zhou, M., Chen, J., Zhang, H., Liu, H., Yao, H., Wang, X., Zhang, W., Zhao, Y. y Yang, N. (2020). KLF10 inhibits cell growth by regulating PTTG1 in multiple myeloma under the regulation of microRNA-106b-5p. *International Journal of Biological Science*, 18(14), 2063-2071.