



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

POSTGRADO DE CIRUGÍA ONCOLÓGICA

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA DR. MIGUEL PEREZ CARREÑO



**COMPARACIÓN DE LA EGRF CON LA EXPRESIÓN DEL P16^{INK4A} Y KI67 EN EL
DIAGNÓSTICO DE LESIONES ESCAMOSAS PREINVASORAS DE CABEZA Y
CUELLO.**

Proyecto de Investigación presentado ante la comisión de postgrado de la Universidad de Carabobo para optar al título de Especialista en Cirugía Oncológica.

AUTOR (a): DRA. MASSIEL S. FERNÁNDEZ B.

TUTOR (a): DRA. EDDY VERÓNICA MORA

OCTUBRE, 2017

COMPARACIÓN DE LA EGRF CON LA EXPRESIÓN DEL P16^{INK4A} Y KI67 EN EL DIAGNÓSTICO DE LESIONES ESCAMOSAS PREINVASORAS DE CABEZA Y CUELLO. Massiel S. Fernández B. Post-grado de Cirugía Oncológica, Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” Valencia. Edo. Carabobo. 2017.

RESUMEN

Antecedentes: El EGRF es una proteína transmembrana, implicada como un oncogén en CECC. El p16INK4a ha sido identificado como un biomarcador de infección por VPH y su presencia en conjunto con el Ki 67 ha sido propuesta como una herramienta diagnóstica de lesiones pre invasoras intraepiteliales cervicales. Es conocida la asociación del VPH con algunos tipos de carcinomas epidermoide de cabeza y cuello (CECC). El propósito de este estudio fue utilizar la inmunotinción de EGRF y compararlo con la expresión de p16/Ki-67 en el diagnóstico de lesiones intraepiteliales preinvasoras de mucosa de cabeza y cuello. **Métodos:** Una serie de 24 lesiones intramucosas provenientes de la cavidad oral y laringe. Se utilizó la técnica de matriz de tejidos y realizamos inmunohistoquímica para EGRF/p16/Ki-67. **Resultados:** El diagnóstico histológico fue de papilomatosis, hiperplasia escamosa y displasia. Inesperadamente el 60% fueron de sexo femenino y 40% masculino. 13% progresaron a CECC entre un mes y 5 años después del diagnóstico. 13% expresaron Ki-67, 23% p16 y 0% EGRF. Todos los pacientes positivos para Ki-67 evolucionaron a CECC. **Conclusión:** La serie es muy pequeña y no permitió encontrar asociación entre EGRF/p16/Ki-67 con las variables. Los datos sugieren que Ki67 y EGRF podrían ser utilizados como biomarcadores para el riesgo de desarrollo de carcinoma infiltrante. La utilidad del p16 como biomarcador de infección por VPH debe ser confirmado con métodos moleculares.

Palabras claves: EGRF, p16INK4a, VPH, Ki 67, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, lesiones intramucosas, papilomatosis.

COMPARISON OF EGRF WITH EXPRESSION OF P16^{INK4A} AND KI67 IN DIAGNOSIS OF HEAD AND NECK INTRAEPITHELIAL LESIONS. Massiel S. Fernández B. Post-degree of Oncology Surgery, Institute of Oncology “Dr. Miguel Pérez Carreño” Valencia. Edo. Carabobo. 2017.

ABSTRAT

BACKGROUND: EGRF is a transmembrane protein, implicated as an oncogene in CECC. P16INK4a has been identified as a biomarker of HPV infection and its presence in conjunction with Ki 67 has been proposed as a diagnostic tool for cervical intraepithelial pre-invasive lesions. The association of HPV with some types of epidermoid carcinomas of the head and neck (CECC) is known. The purpose of this study was to use EGRF immunostaining and to compare it with the expression of p16 / Ki-67 in the diagnosis of preinvasive intarepithelial lesions of the head and neck mucosa.

Methods: A series of 24 intramucosal lesions from the oral cavity and larynx. The tissue matrix technique was used and we performed immunohistochemistry for EGRF / p16 / Ki-67. **Results:** The histological diagnosis was papillomatosis, squamous hyperplasia and dysplasia. Unexpectedly, 60% were female and 40% male. 13% progressed to CECC between one month and 5 years after diagnosis. 13% expressed Ki-67, 23% p16 and 0% EGRF. All patients positive for Ki-67 evolved to CECC. **Conclusion:** The series is very small and did not allow to find association between EGRF / p16 / Ki-67 with the variables. The data suggest that Ki 67 and EGRF could be used as biomarkers for the risk of developing infiltrating carcinoma. The utility of p16 as a biomarker for HPV infection should be confirmed with molecular methods.

Key words: EGRF, p16INK4a, HPV, Ki 67, head and neck epidermoid carcinoma, intramucosal lesions, papillomatosis.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) constituye el sexto tumor maligno más común, con una incidencia anual estimada de 633.000 y 355.000 muertes en todo el mundo.¹⁻³

Las lesiones precursoras son conocidas como alteraciones del epitelio que tienen mayor probabilidad de progresión hacia el CECC. Los términos displasia, neoplasia intraepitelial e hiperplasia epitelial atípica se utilizan casi de manera equivalente. Estas lesiones de potencial maligno implican cambios citológicos y arquitecturales caracterizados por atipias y trastornos de maduración del epitelio de revestimiento de tipo mucoso de la cabeza y el cuello.⁴⁻⁶

En la actualidad entre los factores de riesgo conocidos se reconoce la participación de la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH). Los serotipos de alto riesgo (16, 18, 31 y 33), se describen en la literatura mundial en el carcinoma de cuello uterino, otras neoplasias anogenitales, y en un subgrupo de CECC.³

En las etapas iniciales de la enfermedad, el paciente puede no mostrar ningún síntoma clínico; y como un número tan significativo de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico (nodal regional participación en 43% y la metástasis distante en 10%), lo que lleva a 5 años las tasas de supervivencia de menos de 60%.⁷

Tienden a ser altamente curables si se detecta tempranamente. El VPH posee E6 y E7 las cuales codifican las principales Oncoproteínas del Virus, que promueven la célula a la progresión del ciclo y la replicación del ADN viral. La mayoría de las personas con infección por el VPH no desarrollan Cáncer. La expresión de E6 y E7 es necesaria pero no suficiente para transformación maligna.⁷

Sin embargo, el aumento de la capacidad proliferativa y la evasión de la apoptosis inducida por la E6 y E7 pueden conducir a la acumulación de daño del ADN y mutaciones que en última instancia, pueden dar lugar a la transformación maligna y la Carcinogénesis. La Proteína E7 también conduce a un aumento de la inducción de p16INK4a.¹⁰⁻¹²

La patogénesis del Carcinoma de Cabeza y Cuello no solo está asociada al VPH sino se enfoca la adquisición de seis habilidades fundamentales por parte de las células neoplásicas: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis, y capacidad de invadir los tejidos y producir metástasis. Estos comportamientos no son independientes uno del otro y son resultado de un complejo proceso de alteraciones genéticas en múltiples etapas desde las lesiones Premalignas hasta el Carcinoma.¹¹

El EGRF (receptor del factor de crecimiento epidérmico) es una proteína transmembrana proactiva, proinvasiva, antiapoptótica de 170 kDa dentro de la familia RTK, implicada como un oncogén en CECC. El EGFR activado inicia señalización aguas debajo de cascadas que incluyen Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt, STAT3 y Src quinasas de la familia (SFks). Se sobreexpresa y/o se amplifica en aproximadamente el 90% de CECC, negativo al VPH. Los niveles de expresión de EGRF se correlacionan con estadio avanzado, disminución de la supervivencia y disminución de la sensibilidad a la radiación y la quimioterapia.³³

El p16(INK4a) es un gen supresor que modula la proliferación celular. Se localiza en la región 21 del brazo corto del cromosoma 9 y es un potente inhibidor del complejo ciclina D1/cdk4. Este efecto oncogénico de p16(INK4a) depende de la inhibición de CDK4 / CDK6 en el cáncer células donde se inactiva Rb, cuya inactivación por la proteína E7 sensibiliza a las células a la apoptosis dependiente de p53, pero la proteína E6 inhibe las funciones proapoptóticas de p53. E6 se une directamente a un asociado-E6 proteína (E6-AP), una ubiquitina-ligasa específica para la degradación de p53.¹⁻⁵

E6 y E7 también pueden inducir daño al ADN y aumentar la frecuencia de integración de ADN extraño en el genoma del huésped. La proteína E7 se une a Rb, dando lugar a la sobreexpresión de la p16(INK4a) gen supresor de tumor en Células tumorales infectadas por el VPH. Dicha sobreexpresión por sí sola no es suficiente para identificar con precisión la infección por VPH en los Carcinomas de Células Escamosas en Cabeza y Cuello.¹⁸

Por lo tanto, los marcadores de proliferación celular, como el Ki 67 pueden ser útiles en la valoración del tipo y grado de las lesiones premalignas orales. Así, los cambios en la capacidad proliferativa de las lesiones premalignas orales pueden revelar los cambios pre neoplásicos e indicar su potencial de transformación maligna.

El objetivo de dicha investigación es comparar el EGRF con la expresión del p16(INK4a) y Ki67 en el diagnóstico de lesiones escamosas preinvasoras de Cabeza y Cuello.

MATERIALES Y METODOS

Se identificaron un total de 24 casos de lesiones intraepiteliales localizadas en la mucosa de cabeza y cuello con los diagnósticos de papilomatosis, displasia o neoplasia intraepitelial, atendidos en el Servicio de Cabeza y Cuello en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”, entre Enero del 2005 hasta Diciembre del 2016. Se utilizaron como criterios de inclusión la disponibilidad de los bloques de parafina y la disponibilidad de la información clínica relacionada con la evolución de los pacientes.

CONSTRUCCION DE MATRIZ DE TEJIDO (MICROARRAY)

De los bloques de parafina seleccionados, se obtuvieron secciones histológicas de 4 μ m de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina.

Se prepararon los bloques receptores de un tamaño aproximado de 5 por 4 cm. Cada uno de estos bloques donantes se dividió a la mitad para poseer un duplicado de cada caso. En cada fragmento se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido donante. Se estableció el orden de estos bloques en una plantilla que sirvió después para su lectura en el microscopio.

En la realización del troquelado de los bloques se utilizó una aguja hueca con la cual se extrajo un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con otra aguja de menor calibre se obtuvo el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que

se introdujo en el bloque receptor. Los cilindros fueron introducidos de modo que quedaran al mismo nivel que el bloque de parafina para facilitar el corte de todos ellos.

Al culminar el proceso de troquelado de todos los bloques, se le colocó una capa de parafina al nuevo bloque y se esperó 60 minutos para que la parafina se solidificara y la superficie se alisara.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes histológicos de 2 μm en un micrótomó y cada uno fue colocado en láminas portaobjetos tratadas previamente con poly-L-lisina y secadas durante 45 min a 70°C en estufa, para evitar el desprendimiento de los cortes.

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos, mediante la técnica de avidina-biotina peroxidasa (ABC), después de desparafinación y tratamiento de los tejidos con soluciones recuperadoras de epitopes utilizando vaporizador, los cortes histológicos fueron incubados con el siguiente anticuerpo monoclonal: EGRF, p16INK4a y el índice de proliferación celular Ki67. Se utilizaron controles positivos adecuados para establecer la veracidad de las reacciones.

ANÁLISIS DEL RESULTADO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La cuantificación de la proporción de EGRF y p16 se realizó mediante la observación de las láminas con criterios de todo o nada, es decir positivo o negativo, cuando se identificó la coloración marrón dorada en el núcleo y el citoplasma de las células. La cuantificación del Ki 67 se realizó mediante la observación de las láminas y conteo porcentual de las células, considerándose positivas aquellas con un color marrón dorado nuclear a la técnica. Se expresó en porcentaje.

Los datos obtenidos se sistematizaron en Microsoft Excel ® y fueron analizados a partir del procesador estadístico Statgraphics Plus 5.1. Se comparó la expresión del EGRF y se relacionó con la expresión de p16 y las demás variables en estudio mediante estadística descriptiva bivariada a partir del coeficiente de correlación de Pearson o Spearman. Adoptando como nivel de significancia estadística valores de P inferiores a 0,05.

RESULTADOS

De los 24 pacientes identificados en los cuales se dispuso de los bloques de parafina, 62% fueron del sexo femenino y el 38% del sexo masculino, con un rango de edad que osciló entre los 17 a los 73 años, un promedio de 54,2 con una desviación standard de 16,1 ^{Tabla 1. Grafico 1.} Clínicamente todos los pacientes fueron diagnosticados en el mismo año de inicio de la clínica y el sitio más común fue la lengua. ^{Grafico 2} El diagnostico histológico más frecuente fue de papilomatosis, seguido por hiperplasia escamosa.

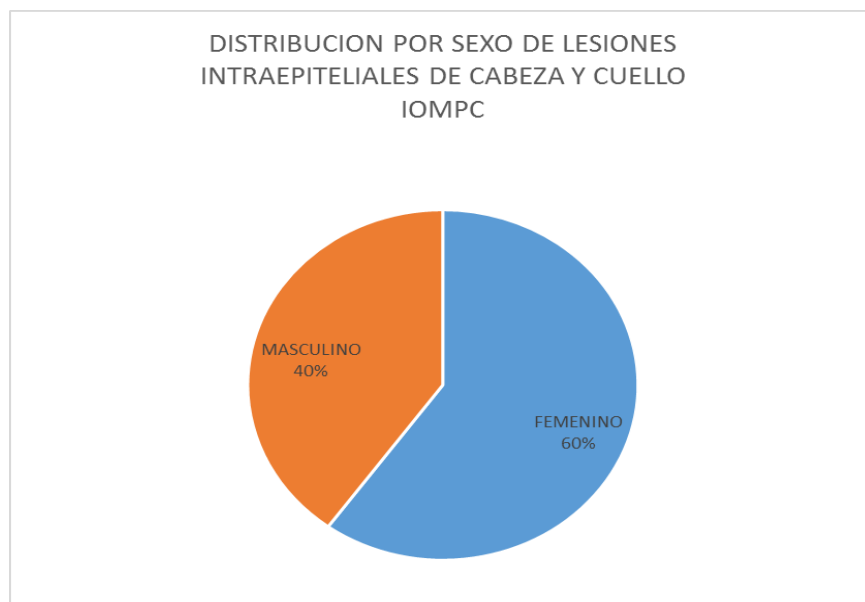
Tabla N° 1

#	SEXO	EDAD	UBICACIÓN	HISTOLOGÍA
1	MASCULINO	75	LENGUA	PAPILOMATOSIS
2	MASCULINO	50	PALADAR BLANDO	HIPERPLASIA
3	MASCULINO	47	LENGUA	HIPERPLASIA
4	FEMENINO	69	LENGUA	PAPILOMATOSIS
5	FEMENINO	69	LENGUA	PAPILOMATOSIS
6	FEMENINO	46	LENGUA	HIPERPLASIA
7	FEMENINO	63	LENGUA	HIPERPLASIA
8	FEMENINO	35	LARINGE	NODULO LARINGEO
9	MASCULINO	46	PALADAR BLANDO	PAPILOMATOSIS
10	FEMENINO	63	PALADAR BLANDO	PAPILOMATOSIS
11	FEMENINO	38	CUERDA VOCAL	HIPERPLASIA
12	MASCULINO	32	LABIO INFERIOR	HIPERPLASIA
13	FEMENINO	56	LENGUA	PAPILOMATOSIS
14	MASCULINO	72	LARINGE	DISPLASIA
15	FEMENINO	56	LENGUA	HIPERPLASIA
16	FEMENINO	25	LARINGE	PAPILOMATOSIS
17	FEMENINO	50	LENGUA	PAPILOMATOSIS
18	MASCULINO	60	LARINGE	PAPILOMATOSIS
19	FEMENINO	73	CUERDA VOCAL	DISPLASIA
20	MASCULINO	59	LENGUA	PAPILOMATOSIS
21	FEMENINO	51	LARINGE	PAPILOMATOSIS
22	FEMENINO	70	LENGUA	HIPERPLASIA

23	MASCULINO	70	LARINGE	HIPERPLASIA
24	MASCULINO	59	LARINGE	HIPERPLASIA

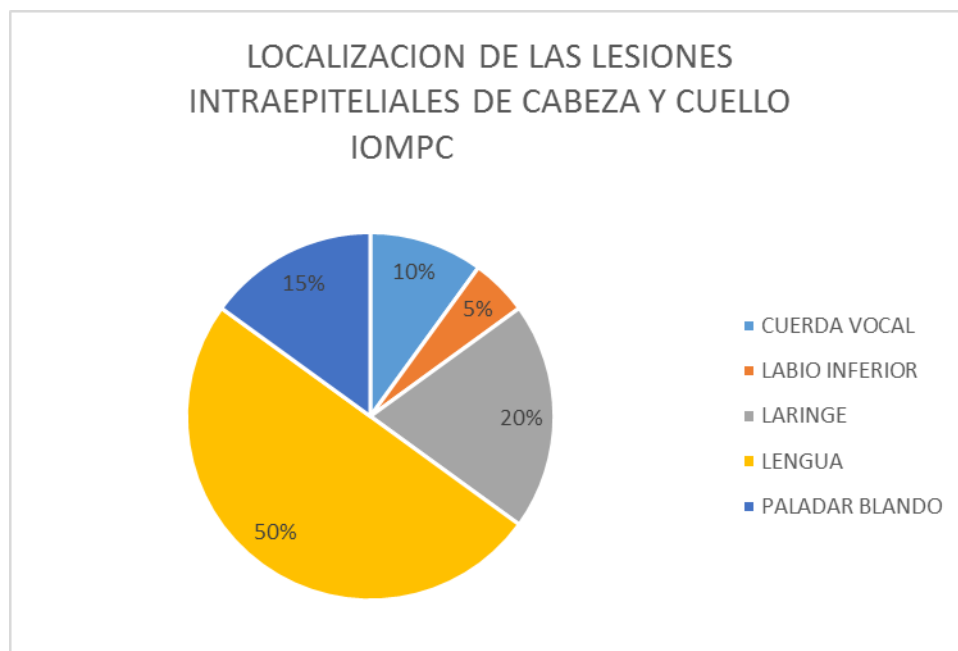
Fuente: Historias médicas IOMPC

GRÁFICO 1



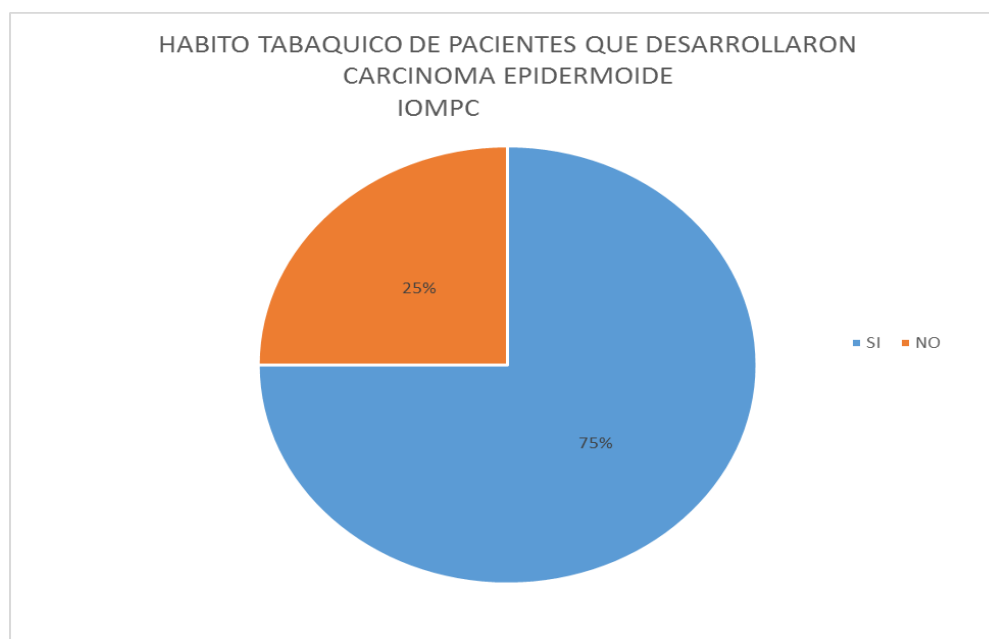
Fuente: Historias médicas IOMPC

GRÁFICO N° 2



Dentro de los factores de riesgo encontrados, el hábito tabáquico acentuado entre 4 cigarrillos y 2 cajas diarias estuvo presente en 75% de los pacientes, 7 del sexo femenino y 5 del sexo masculino.

GRÁFICO 3



Fuente: Historias médicas IOMPC

El cuadro clínico estuvo caracterizado por lesión dolorosa, con aumento de volumen de la misma y sintomatología de disfagia y disfonía. El diagnóstico se realizó principalmente por examen físico, exploración de cavidad orofaríngea, realización de laringoscopia indirecta en la consulta y corroborado por toma de biopsia de las lesiones sospechosas; la mayoría biopsias excisionales y por nasofibrolaringoscopia.

Durante su evolución clínica, el 13% (4) de los 24 pacientes estudiados, progresaron a carcinoma epidermoide infiltrante y un paciente presentó un adenocarcinoma adenoideo quístico, este tenía el diagnóstico de una lesión papilar benigna de paladar blando. De los 4 pacientes con carcinoma epidermoide, 3 eran del sexo femenino y uno masculino, con edades que oscilaban entre 50 y 75 años. ^{Tabla 2 y Gráfico 4}. El diagnóstico de carcinoma epidermoide fue realizado entre 1 mes posterior al diagnóstico de papilomatosis hasta 5 años.

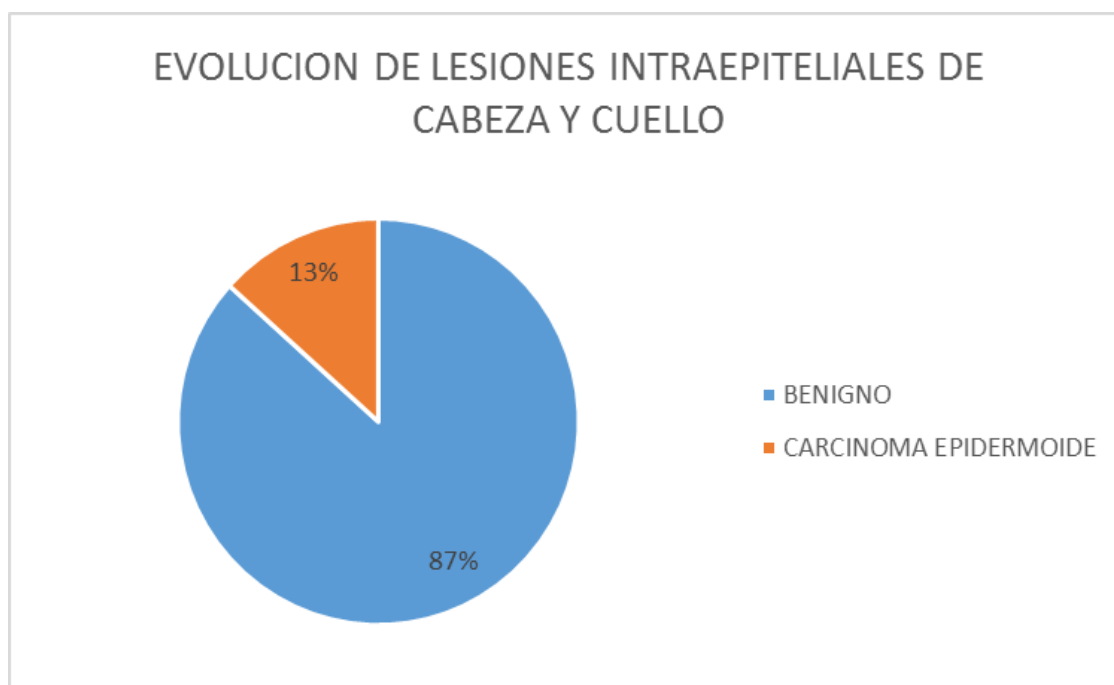
La única paciente con el diagnóstico de displasia leve de cuerda vocal, era de 73 años, presento un carcinoma epidermoide de laringe ST I, 4 años más tarde.

TABLA N° 2. EVOLUCIÓN CLÍNICA

#	SEXO	EDAD	UBICACIÓN	HISTOLOGÍA	EVOLUCIÓN
1	MASCULINO	75	LENGUA	PAPILOMATOSIS	CA EPIDERMOIDE
2	MASCULINO	46	PALADAR BLANDO	PAPILOMATOSIS	CA ADENOIDEO QUISTICO
3	FEMENINO	50	LENGUA	PAPILOMATOSIS	CA EPIDERMOIDE
4	FEMENINO	56	LENGUA	PAPILOMATOSIS	CA EPIDERMOIDE
5	FEMENINO	73	CUERDA VOCAL	DISPLASIA	CA EPIDERMOIDE

Fuente: Historias médicas IOMPC

GRÁFICO N° 4



Fuente: Historias médicas IOMPC

Al realizar la técnica de inmunohistoquímica, se desprendieron un total de 5 cortes de las láminas, con los siguientes resultados. Un total de 18 casos fueron negativos para el p16 y 6 casos expresaron p16 en células basales, focal con una intensidad moderada, 3 con el diagnóstico histológico de papilomatosis y 3 con hiperplasia ^{Tabla 3}.

Los 3 pacientes con el diagnóstico histológico de papilomatosis eran del sexo femenino y no hay evidencia de desarrollo de carcinoma epidermoide, en nuestra institución.

TABLA 3. EXPRESION DE p16

p 16	F	%
Negativo	18	77
Positivo	6	23
	24	100

Fuente: Datos de la investigación.

Así mismo de los 24 casos a quienes se les realizó el Ki 67, 2 expresaron el anticuerpo en las capas basales, con una intensidad moderada, en un 15% de las células evaluadas. De estos pacientes uno tenía el diagnóstico de papilomatosis y otro el diagnóstico de una displasia leve.

De estos 2 pacientes con expresión de Ki 67, ambos desarrollaron Carcinoma Epidermoide, uno de ellos con un diagnóstico de displasia leve de cuerda vocal ^{Tabla 4}.

TABLA 4. EXPRESION DE Ki 67

Ki 67	F	%
Negativo	22	87
Positivo	2	13
	24	100

Fuente: Datos de la investigación.

En cuanto a la expresión de EGFR ninguno de los pacientes estudiados resultó positivo a dicho marcador, con el 100% ^{Tabla 5}.

TABLA 5. EXPRESION DE EGFR

EGFR	F	%
Negativo	24	100
Positivo	0	0
	24	100

Fuente: Datos de la investigación.

DISCUSIÓN

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello o carcinoma escamoso (CECC) es aquel tumor epitelial maligno, que afecta el epitelio mucoso desde la cavidad oral, desde la superficie mucosa de los labios, faringe, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe y laringe. A pesar de localizaciones anatómicas diferentes, comparten una serie de factores de riesgo comunes. Tradicionalmente se ha asociado al hábito tabáquico y consumo de alcohol. Sin embargo en los últimos años, se ha detectado la presencia de pacientes con evidencia de infección por VPH, capaces de desarrollar un carcinoma epidermoide. Desde el punto de vista epidemiológico, se trata de pacientes más jóvenes que en el CECC relacionado con el hábito tabáquico. Prácticamente se trata de dos enfermedades, aquellos con tumores no relacionados al VPH y los relacionados al VPH, estos últimos con un riesgo menor de mortalidad.³⁻⁶

Las lesiones preinvasoras o premalignas del CECC, son una serie de cambios patológicos intraepiteliales que cursan con trastornos de la maduración del epitelio, en ocasiones, muy parecidos a cambios reactivos como hiperplasia de células basales o cambios histológicos asociados a la infección por el VPH. Estas lesiones son conocidas como displasia o neoplasias intraepitelial laríngea (NIL), haciendo una analogía a lo que ocurre en el cuello uterino.

En dicha investigación, identificamos un total de 24 pacientes, la mayoría de ellos con cambios histológicos de VPH (papilomatosis) y un paciente con una displasia de cuerda vocal. A diferencia de lo descrito en la literatura mundial, estos pacientes

demostraron un predominio importante en el sexo femenino y con una edad significativamente mayor a lo que se describe en lesiones por VPH.¹⁹⁻²¹

El p16 es una oncoproteína supresora de CDK4,6 que en numerosos estudios es interpretado como un equivalente a la infección por el VPH. Sin embargo en nuestra investigación, solo se demostró p16 en 6 pacientes, 3 con papilomatosis y 3 con hiperplasia.

De manera semejante, solo 2 casos se identificaron con expresión del índice de proliferación celular Ki 67. Ambos fueron de sexo femenino, uno desarrollo un carcinoma epidermoide de lengua y otra desarrollo un carcinoma epidermoide de laringe 5 años después.

Llama la atención el bajo índice de expresión de p16. Entre los factores que se pueden postular están: defectos pre analíticos como fallas en la fijación o sobreexposición al fijador (conociendo que en la mayoría de las instituciones públicas o privadas del país, no se emplea formol tamponado), fallas en el almacenamiento de los bloques, con inadecuada preservación del material antigénico, defectos en la titulación del anticuerpo empleado, especialmente si se trata de casos con baja expresión de antígenos.

Sin embargo es importante el empleo de una prueba gold estándar, como métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por el VPH y además identificar si se trata de una serotipo de alto riesgo, riesgo intermedio o alto riesgo.²³⁻³⁴

La expresión de Ki 67 en un caso de displasia leve en la capa basal de la mucosa, permite confirmar el diagnóstico histológico. Adicionalmente, es importante recalcar que el 20% de los pacientes con lesiones intraepiteliales o preinvasoras desarrollaron carcinoma epidermoide infiltrante.

En cuanto a la falta o ausencia de expresión del EGRF en dicha investigación, se debe conocer que este tiene predilección por casos de CECC, mientras que en las lesiones preinvasoras su expresión o amplificación puede estar presente con un bajo porcentaje. Para esto, autores sugieren el uso de técnicas de IHQ objetivas

relacionadas con la expresión de la proteína EGRF y la amplificación de genes por métodos de FISH.³⁴

La amplificación del gen de EGRF puede facilitar la diferenciación de lesiones con alto potencial maligno antes de desarrollar CECC, conduciendo a mejorar el seguimiento de las lesiones intraepiteliales, prevención y detección temprana de patologías neoplásicas.

La compleja y día a día cambiante biología molecular del EGRF también pareciera jugar un papel primordial, ya que, el aumento de los niveles de expresión de ARNm de los ligandos de EGRF (AREG, EGF, HBEGF y BTC) predice el pronóstico en una relación casi dependiente del número de dosis-ligando. Los ligandos de EGRF no sólo tienen afinidad diferente por el receptor, sino hay una modulación de la dosis ligando/específica³⁵.

Esto puede explicar por qué los pacientes con tumores que expresan aumento de los niveles de ARNm para EGRF-ligandos tienen un mal pronóstico, ya que este activaría todas las señales intracelulares inducibles por vías EGRF³⁵.

Las correlaciones entre el EGRF, p16 y ki67 están mediadas por la infección por VPH. La proteína del gen E5 del ADN del VPH es una pequeña proteína hidrofóbica que consta de 83 aminoácidos que se localiza en la membrana celular, el aparato de Golgi y el endosoma. E5 mejora la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y sus vías de transducción de la señal aguas abajo, dando lugar a una mayor actividad mitogénica⁶.

Los mecanismos propuestos para la regulación positiva de E5 del VPH incluyen el complejo de proteína EGRF-E5 que afecta la actividad de EGRF, la inhibición E5 de la acidificación endosómica que inhibe la degradación del EGRF endocítico y la inhibición E5 del tráfico de endosomas tempranos a tardíos para retrasar la degradación de EGRF. La activación anormal se observa en muchas neoplasias epiteliales como el cáncer de cabeza y cuello y se asocia con peores resultados³⁴.

El análisis sistemático con técnicas de inmunohistoquímica para p16, EGFR y ki67, incluyendo localización celular, demuestra patrones distintos que pueden tener potencial de pronóstico que supera los métodos actuales.

Por otro lado, la sobreexpresión de p16 (INK4a) en UAB-3 aumenta la actividad de EGFR y aumenta la expresión de MMP1 y MMP3, posiblemente a través de la activación de STAT3.

Los patrones característicos de tinción y la reactividad muestran variabilidad para p16, EGFR y ki67. En general, p16 es significativamente más probable que sea positivo para la enfermedad benigna, mientras que EGFR para la maligna. Su expresión en líneas celulares es hasta 50 veces mayor que en las células normales⁶.

El exceso de expresión aparece hasta en el 43%-100% de los tumores, incluso en las lesiones precoces, en pequeños porcentajes. La célula tumoral puede también sobreexpresar EGF, favoreciendo así la estimulación autocrina del EGFR y relacionarlo con una peor supervivencia y sobrevida global⁶.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Las lesiones intraepiteliales mas frecuentes en la mucosa de la cabeza y el cuello son las papilomatosis.
- En nuestras medias estas lesiones intraepiteliales son más frecuentes en mujeres que en hombres.
- El 20% de estos pacientes desarrollaron un CECC, con predominio del sexo femenino.
- El 75% de los pacientes que desarrollaron un CECC, referían hábito tabáquico intenso.
- El 23% de los pacientes expresaron p16. El 13% de los pacientes expresaron Ki67. Y el 0% EGFR.

- Basado en estos resultados, a pesar de lo pequeña de la muestra, permite inferir que probablemente el VPH no sea un agente causal de CECC como en Europa o en Estados Unidos.
- Se recomienda en este caso hacer diagnóstico de infección por VPH, mediante técnica de PCR, Western blot o captura híbrida, para poder establecer el valor diagnóstico del p16 y EGFR en las lesiones intraepiteliales mucosas de cabeza y cuello.
- Se necesitan estudios futuros con más pacientes y un análisis en profundidad de la expresión celular y coloración macroscópica para p16 y EGFR para validar estos hallazgos.
- El EGFR se expresa con predominio en el CECC, mientras que el p16 y ki67 en lesiones preinvasoras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chai R, Lambie D, Mukesh Verma & Chamindie Punyadeera. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Medicine* 2015, 4(4):596–607.
2. Sudbo J, Kildal W, Johannssen AC, et al. Gross genomic aberrations in precancers: Clinical implications of a long-term follow-up study in oral erythroplakias. *J Clin Oncol* 2002;20:456.
3. Sibel Elif Gültekin, Burcu Sengüven, Jens Peter Klussmann and Hans Peter Dienes. p16ink 4A and Ki-67 expression in human papiloma virus related head and neck mucosal lesions. Article in *INVESTIGACIÓN CLÍNICA*, March 2015. <http://www.researchgate.net/publication/272889056>.
4. Cosme Ereño Zárate. The updated WHO Head and Neck Tumours Classification (2005). Epithelial precursor lesions and tumours of the larynx, hypopharynx and trachea. *REV ESP PATOL* 2007; Vol 40, n.º 1: 3-10.
5. Carmen Gutiérrez Bonet Laura Hernández Horlock Juan Diego Sánchez Vega. Lesiones preneoplásicas de la cavidad oral: Revisión bibliográfica últimos 12

meses. Alumnos de 2º Odontología Universidad Rey Juan Carlos. Foros de Patología de la URJC. <http://biopat.cs.urjc.es/conganat>.

6. María Sereno Moyano, Enrique Espinosa Arranz, Beatriz Castelo Fernández y Manuel González Barón. Biología Molecular de los cánceres de cabeza y cuello. Servicio de Oncología Médica. Hospital La Paz. Madrid. España. Rev Oncol 2003;5(9):500-10.
7. Dr. Yuniesky Jiménez Rodríguez Dr. Rafael Michel Coca Granado. Prognostic factors in epidermoid carcinoma of head and neck. Acta Médica del Centro / Vol. 7 No. 4 2013. Hospital Clínico Quirúrgico “Arnaldo Milián Castro”, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
8. López-Durán M, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Díez-Pérez R, Bascones-Martínez A. Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral. Av. Odontoestomatol 2010; 26 (4): 189-196.
9. D Sidransky. Cancer of the head and Neck. Principles and Practice of Oncology, 6th Edition. Chapter 30, pag1-2. 2001.
10. Lippman SM, Spitz MR, Huber MH, Hong WK. Strategies for chemoprevention study of premalignancy and second primary tumors in the head and neck. Curr Opin Oncol 1995;7:234.
11. Lotan R, Xu XC, Lippman SM, et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. N Engl J Med 1995;332:1405.
12. Boyle JO, Koch W, Hruban RH, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer res 1993;53:4477.
13. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. Nat Genet 1995;11:210-2.
14. Reed A, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16/CDKN2/MTS- 1/INK4A inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 1996;56:3630-3.
15. Jares P, Fernandez PL, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. Cancer Res 1994;54:4813-7.
16. Rosin MP, Cheng X, Poh C, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. Clin Cancer Res 2000;6:357-62.

17. Urba S. Head and Neck Cancer. Hematology Oncology Clinics of North America. Vol 13, N° 4, 1999.
18. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. Hum Pathol 1999;30:1221.
19. Bryne M, Boysen M, Alfes CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The important area of tumour prognosis? Aancer Res 1998; 18:4747-64.
20. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hunter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, et al., eds. American Joint Committee on cancer (AJCC). AJCC Cancer staging manual. 5th ed. J. B. Lippincott: Philadelphia, 1997. p.24-30.
21. Sciuba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. JADA 2001; 32 (Suppl): 12S- 18S.
22. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. Eur J Cancer Oral Oncol 1997; 33B: 302-12.
23. Bungard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. Eur J Cancer Oral Oncol, 1994;30B: 323-8.
24. Zhang SY, Kleinszanto AJP, Sauter ER, et al. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. Cancer Res 1994;54:5050.
25. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. Nat Genet 1995;11:210.
26. Reed A, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16CDKN2/MTS-1/INK4A inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 1996;56:3630.
27. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. Oncogene 1997;14:1799.
28. Mao L, Merlo A, Bedi G, et al. A novel p16INK4A transcript. Cancer Res 1995;55:2995.
29. Liggett WH Jr, Sewell DA, Rocco J, et al. p16 and p16 are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. Cancer Res 1996;56:4119.

30. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709.
31. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2:755.
32. Eric M. Genden, MD. 5 Things to Know About HPV-Related Throat Cancer. Special to Everyday Health. By Everyday Health Guest Columnist. Published May 20, 2016.
33. Bauman, Julie E, Umamaheswar Duvvuri, et al. Randomized, placebo-controlled window trial of EGFR, Src, or combined blockade in head and neck cancer. *JCI Insight*. 2017;2(6):e90449.
34. Braut, Tamara, Krstulja Mila, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Protein Expression and Gene Amplification in Normal, Hyperplastic, and Cancerous Glottic Tissue: Immunohistochemical and Fluorescent in Situ Hybridization Study on Tissue Microarrays. Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery Clinical. Hospital Center Rijeka. 2009. Croatia.
35. Jian Gao, Camilla H. Ulekleiv and Trond S. Halstensen Epidermal growth factor (EGF) receptorligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF- induced amphiregulin expression Gao et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2016) 35:151.
36. Isayeva T, Xu J, Ragin C, Dai Q, et al. The protective effect of p16(INK4a) in oral cavity carcinomas: p16(Ink4A) dampens tumor invasion-integrated analysis of expression and kinomics pathways. *Mod Pathol*. 2015 May;28(5):631-53. doi: 10.1038/modpathol.2014.149. Epub 2014 Dec 19.