



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

“Asociación entre detección de Virus Papiloma Humano de alto riesgo y expresión nuclear de β -catenina en Carcinoma Oral de Células Escamosas.”

Gabriel Ignacio Rojas Zúñiga

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. TM Montserrat Reyes R.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Andrea Maturana R.

Prof. Dr. Juan Pablo Aitken S.

**Adscrito a Proyecto FONDECYT N°1120248
Santiago - Chile
2015**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

“Asociación entre detección de Virus Papiloma Humano de alto riesgo y expresión nuclear de β -catenina en Carcinoma Oral de Células Escamosas.”

Gabriel Ignacio Rojas Zúñiga

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. TM Montserrat Reyes R.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Andrea Maturana R.

Prof. Dr. Juan Pablo Aitken S.

**Adscrito a Proyecto FONDECYT N°1120248
Santiago - Chile
2015**

AGRADECIMIENTOS

A Héctor y Verónica, mis padres, por todo el esfuerzo y entrega, por ser el pilar fundamental durante este proceso y por el amor incondicional que día a día me entregan.

A Felipe Andrés, estoy seguro que desde allá, donde te encuentres, estas muy orgulloso.

A Sofía, por ser mi sobrina favorita y hacerme querer ser mejor tío, padrino y amigo cada día.

A todos quienes conforman el maravilloso espacio Rioseco, por los cumpleaños, las navidades, los años nuevos y todos los eventos dignos de reunión. Que los lazos que nos unen no hagan mas que fortalecerse todos los días.

A la profesora TM Montserrat Reyes por haberme guiado en el desarrollo de este trabajo y por regalarme su amistad.

A mis profesores y amigos Dra. Andrea Maturana y Dr. Juan Pablo Aitken, por su apoyo siempre, sus consejos y sobretodo por poner en mi su confianza.

A mis compañeros y amigos con los que caminamos juntos estos 6 años, por los buenos y malos momentos, por los estudios, los pacientes, los bailes y las risas.

A Diego por los años de amistad que hemos compartido, por estar en todas, por lo que fue y sobretodo por lo que viene.

A todos los docentes y funcionarios que durante la carrera, contribuyeron de una u otra forma con su conocimiento y consejo, a mi formación como profesional y como persona.

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente en cavidad oral. La literatura señala un posible rol etiológico del virus papiloma humano (VPH) en cánceres de cabeza y cuello, sin embargo, en carcinomas orales su participación es aún controversial. Por su parte, la proteína β -catenina actúa como regulador en la vía Wnt canónica, cuya activación induce su estabilización, acumulación citoplasmática y posterior translocación nuclear, afectando la transcripción de genes asociados a crecimiento y proliferación celular. La acumulación nuclear de β -catenina en cánceres cervical y orofaríngeo VPH positivos parece ser directa consecuencia de la expresión de oncoproteínas virales E6/E7 del VPH. Dicha acumulación serviría como un posible marcador para diferenciar poblaciones VPH positivas versus VPH negativas. Sin embargo, no existen estudios al respecto en COCE.

El objetivo de este estudio fue asociar expresión nuclear de β -catenina y presencia de VPH de alto riesgo (VPH-AR) en COCE.

Estudio observacional analítico de corte transversal. Se utilizó una muestra de 60 casos con diagnóstico COCE. Se realizó PCR para amplificación de VPH genérico y técnica de inmunohistoquímica para detección β -catenina. Posteriormente se efectuó el análisis estadístico de los datos mediante software Stata 11.0.

De un total de 60 casos analizados a través de PCR convencional, 8 casos (13.3%) resultaron positivos en la detección de VPH genérico. 7 muestras de COCE (11.6%) mostraron expresión nuclear de β -catenina. Cinco (71.4%) fueron VPH positivas; 4 fueron VPH-16, con moderada o intensa expresión nuclear en más del 70% de las células; una muestra fue VPH-18. Dos muestras VPH-negativas tuvieron expresión nuclear de β -catenina en menos del 10% de las células. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.0001$. La prevalencia del VPH 16/18 en muestras de COCE fue similar a lo reportado en la literatura. Así, la expresión de β -catenina nuclear en células epiteliales en COCE estaría relacionado a la presencia de VPH 16/18. Esto nos permite sugerir a β -catenina como un nuevo marcador inmunohistoquímico complementario, más efectivo y que al ser detectado en muestras de COCE permitiría predecir la presencia del virus.

Palabras clave: Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), Virus Papiloma Humano (VPH), β -catenina.

INDICE

1.1 INTRODUCCIÓN	8
1.2 MARCO TEORICO	10-19
1.2.1 Carcinoma oral de células escamosas (COCE).	10
1.2.2 Virus Papiloma Humano (VPH).	12
1.2.2.1 Estructura y clasificación.	12
1.2.2.2 Organización Genómica.	14
1.2.3 COCE y su asociación con VPH.	15
1.2.4 Vía de señalización Wnt/ β -catenina.	16
1.2.5 Vía de Wnt y cáncer cervical.	18
1.2.6 Wnt/ β -catenina y cáncer oral.	19
1.2.7 Argumento del problema.	19
2 HIPÓTESIS	20
3 OBJETIVO GENERAL	20
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 METODOLOGÍA	21-30
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	21
5.2 FUENTE DE INFORMACIÓN	21
5.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	21
5.3.1 Selección de la muestra.	21
5.3.2 Criterios de inclusión.	21
5.3.3 Criterios de exclusión.	22
5.3.4 Tamaño de la muestra.	22

5.4 PROCEDIMIENTO	22
5.4.1 Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH.	22
5.4.2 Recopilación de datos demográficos.	23
5.4.3 Preselección de los casos registrados.	23
5.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	23
5.6 TÉCNICA IHQ PARA LA DETECCIÓN DE β-CATENINA	25
5.6.1 Procesamiento previo a la técnica IHQ.	25
5.6.2 Técnica IHQ.	25
5.7 RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS	26
5.7.1 Observación de células inmunopositivas.	26
5.8 VARIABLES DEL ESTUDIO	27
5.9 CONTROLES DE CALIDAD	28
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
6 RESULTADOS	31-38
6.1 Determinar la presencia de VPH - AR en COCE.	31
6.2 Caracterización de las muestras de COCE en ausencia y presencia de VPH 16/18.	31
6.3 Determinar expresión de β -catenina en COCE.	35
7 DISCUSIÓN	39-45
8 CONCLUSIONES	46
9 FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO	47
10 CONSIDERACIONES ÉTICAS	47
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48-56
12 ANEXO	57-62

1.1 INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas es el tipo histológico más prevalente de tumores de la cavidad oral. Este tipo de cáncer presenta una tasa de supervivencia a los 5 años cercana al 50%, lo que se debe por un lado a su agresividad y por otro a que usualmente es diagnosticado en estadios muy avanzados. Además, es un cáncer altamente infiltrante que tiende a generar compromiso linfático y metástasis en forma temprana. Los pacientes que padecen esta patología sufren un importante deterioro en su calidad de vida, afectándolos no solo en lo físico y funcional sino que también en lo psicológico y emocional.

La infección por el virus papiloma humano (VPH) es ampliamente reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (CCU), sin embargo en los últimos años se ha sugerido un papel etiológico del VPH en un subconjunto de cánceres de cabeza y cuello (CCC), principalmente cánceres orofaríngeos. La literatura describe que el número de parejas sexuales, la edad de inicio de relaciones sexuales y ciertas conductas y prácticas sexuales como el sexo oral están directamente relacionados con la infección por el VPH en los tejidos genitales y orales.

Pese a constituir la misma entidad nosológica, se considera que los cánceres asociados al VPH se comportan de forma distinta a los tumores no asociados a VPH. Es así que se ha establecido que los pacientes positivos para VPH tienen un mejor resultado clínico con radioterapia y quimioterapia, ya que en general ofrecen una mayor supervivencia al tener una disminución significativa de la carga viral y con ello, una respuesta completa a este tipo de tratamiento, en comparación a pacientes negativos para VPH. Por lo tanto, es posible suponer una asociación entre la presencia del virus y un aumento de la supervivencia de los pacientes.

Si bien la etiología del carcinoma oral de células escamosas (COCE) es poco clara, existen factores de riesgo asociados, entre ellos, el tabaquismo y el abuso de alcohol. Sin embargo, estos tumores también se desarrollan entre un 10 a un 20% en personas que nunca han fumado y que no beben alcohol, abriéndose por tanto

la posibilidad de participación de otros agentes, como las infecciones virales. No obstante, la participación del VPH en el desarrollo del COCE, así como también los mecanismos por los cuales induce la transformación maligna sigue siendo un tema de debate.

La vía de señalización Wnt involucra genes altamente conservados de proteínas secretoras entre cuyas funciones biológicas destaca el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. La proteína β -catenina actúa como regulador en la vía Wnt canónica, cuya activación induce su estabilización, acumulación citoplasmática y posterior translocación nuclear, afectando la transcripción de genes asociados a crecimiento y proliferación celular. La acumulación nuclear de β -catenina en cánceres cervical y orofaríngeo VPH positivos parece ser directa consecuencia de la expresión de oncoproteínas virales E6/E7.

Por lo anteriormente señalado, resulta de interés determinar la presencia de VPH en muestras de COCE en la población chilena y establecer si existe una asociación entre la infección por VPH y la expresión de moléculas relacionadas al control del ciclo celular y a la actividad proliferativa como β -catenina. Esto se fundamenta en cierta similitud con la situación encontrada en CCU, tumores anogenitales y cáncer orofaríngeo, ya que tanto la presencia como el rol etiopatogénico del VPH en COCE es controversial y cada serie de casos presenta resultados distintos. No existen estudios similares en nuestro país. El objetivo de este estudio fue determinar la asociación que existe entre la presencia de VPH de alto riesgo (16/18) con la expresión nuclear de β -catenina en COCE, lo cual puede tener implicaciones no sólo para el diagnóstico y una mejor comprensión fisiopatológica del COCE, sino también en su prevención y tratamiento.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral y constituye un importante problema para la salud pública mundial. En el reporte de GLOBOCAN del año 2012 se estima una incidencia anual mundial de 198.975 casos de cáncer oral, incluyendo labio y en 97.940 casos constituyó la causa de muerte (Ferlay J y cols., 2013). En Estados Unidos corresponde al 3% de los diagnósticos de cáncer, se estima que se diagnosticaron 40.250 casos de cáncer oral y faríngeo en el año 2012 y fue la causa de muerte para 7.850 personas (Siegel y cols., 2012). Nuestro país solo cuenta con registros sobre incidencia en Valdivia (1993), Antofagasta (1998) y Concepción (2003), sin registros a nivel nacional. En un estudio de Riera y cols., utilizando datos de mortalidad recolectados en el Instituto Nacional de Estadística (INE) entre los años 1982 a 2002, se estimó que el cáncer oral y faríngeo corresponde al 1,6% del total de casos de cáncer, con una razón hombre: mujer de 2,3:1. Las muertes causadas por cáncer oral y faríngeo fueron el 1% del total de muertes por cáncer entre los años 1995-2002 y su localización más frecuente fue lengua, registrándose para el año 2002, 193 defunciones, es decir, una tasa de mortalidad de 1,33/100.000 habitantes por esta causa (Riera y cols., 2005).

Entre los principales factores de riesgo asociados al cáncer oral y faríngeo se encuentran el tabaquismo, abuso de alcohol, bajo consumo de frutas y vegetales, bajo nivel socioeconómico y posiblemente el virus del papiloma humano (VPH) (Conway y cols., 2008 y Scully, 2009). Clínicamente podemos visualizarlo como úlceras que no cicatrizan, lesiones exofíticas, leucoplásicas o eritroplásicas (Neville y cols., 2009).

El desarrollo del COCE es un proceso secuencial, con acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, metabólicas, hormonales y otras, consecutivas a la exposición de agentes carcinogénicos (Yokota, 1993 y Haddad, 2008).

Los cánceres de la cabeza y cuello (CCC) representan un amplio grupo de tumores que afectan la cavidad oral, cavidad nasal, senos paranasales, faringe, laringe e hipolaringe (Leemans y cols., 2011 y Campisi, 2009). El COCE es histológicamente idéntico a los carcinomas de células escamosas de otros sitios de la región, presentando signos de diferenciación escamosa, con queratina extracelular o intracelular y/o uniones intercelulares. Las células tumorales generalmente se encuentran adheridas unas a otras como en un "mosaico". El tumor puede estar dispuesto en nidos, masas, como grupos pequeños de células e incluso como células aisladas. La invasión se produce como proyecciones romas o cordones finos desiguales e irregulares, existiendo por lo tanto dos patrones: expansivo e infiltrativo respectivamente. Pueden ser clasificados en bien, moderado o pobremente diferenciado según su grado de diferenciación (OMS, 1998).

El COCE se caracteriza por una alta tasa de invasión local y metástasis cervical, la que afecta directamente al pronóstico de los pacientes (Köhler, 2012). La metástasis de ganglios linfáticos se considera hasta el momento el predictor más importante en las tasas de sobrevida. El 50% de los pacientes presentan compromiso ganglionar detectable al momento del diagnóstico, de este grupo, menos del 40% sobrevive luego de 5 años, en comparación con el 90% de sobrevida de pacientes sin metástasis ganglionar; es decir, la tasa de sobrevida disminuye alrededor de un 50% cuando existen metástasis a nivel ganglionar (Sano y cols., 2007 y Grimm, 2012).

La tasa de sobrevida global de pacientes con cáncer oral no ha variado significativamente durante los últimos 20 años, a pesar de los avances en el campo oncológico. En Chile, un estudio de Bórquez y cols., describe una sobrevida global para cáncer oral, no exclusivo para COCE, del 57% a los 5 años, lo cual varía desde un 86% hasta un 51% según su estadio (Bórquez y cols., 2011); concordante con lo reportado en otros países, (Hsieh y cols., 2012; Hicks y cols., 1997; Sessions y cols., 2002) pero levemente superior a lo reportado en Brasil en el año 1997 de 43,2% (Carvalho y cols., 2004).

Actualmente las pautas de tratamiento se basan en indicadores clínicos como el estadio TNM y ubicación; y con base a parámetros histológicos, como el grado de diferenciación y profundidad de invasión. Sin embargo, estos factores no son del todo precisos para el pronóstico (OMS, 1998; Sano, 2007 y Kirita, 1994).

Un factor en discusión y en constante revisión es el VPH, que ha sido indicado como factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma de células escamosas (CCE) tanto para CCU como para cáncer orofaríngeo. (Pierre F. y cols., 1997; Morj J y cols., 2001). Existen estudios que lo consideran como factor protector en orofaríngeo (Lindel K. y cols., 2001; Psyrri A. y cols., 2008; Campisi G. y cols., 2009) y que presente en un paciente con COCE, éste respondería de mejor manera al tratamiento con radioterapia, mejorando su pronóstico (Lindel K. y cols., 2001). Esto se atribuye a que las células tumorales infectadas por VPH son mas sensibles a radioterapia que las células VPH negativas (Jadhav KB y Gupta N, 2013).

1.2.2 VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae, es de simetría icosaédrica, carece de envoltura, posee un ADN circular con 8000 pares de bases y un tropismo epitelial estricto (ZurHausen, 2009).

Se ha reportado la existencia de más de 150 tipos diferentes de este virus, sin embargo, solo se ha secuenciado el genoma completo de unos 100 tipos (de Villiers y cols., 2004; Bernard, 2005; Sand, 2014).

1.2.2.1 Estructura y Clasificación

Los virus pertenecientes a esta familia, presentan una cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura y su tamaño oscila entre los 40 y 55 nanómetros. Su genoma constituye entre el 10 al 13% del peso de la partícula viral y consta de una molécula no segmentada y circular de ADN de doble cadena (de Villiers y cols., 2004).

1.2.2.2 Organización genómica

Estructuralmente la organización genómica de los distintos genotipos de VPH es bastante similar, ya que las secuencias codificantes (marcos abiertos de lectura u ORF) tienen longitudes semejantes y ocupan posiciones parecidas en el ADN (Thierry, 2009).

En el genoma del VPH se distinguen una región temprana y una región tardía. La primera contiene los genes E1 a E7, los cuales codifican proteínas implicadas en los procesos de replicación y transcripción de ADN viral y la segunda contiene los genes L1 y L2 implicados en la producción de la cápside viral (Figura 1). Cabe señalar que mientras los genes de expresión temprana poseen secuencias muy diferentes entre los distintos tipos de VPH, los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta particularidad transforma a L1 en antígeno específico para la detección de ADN viral, ya que es el componente principal de la cápside, a diferencia de E6 y E7, claves para la detección tipo-específica debido a la alta variabilidad inter-tipo que poseen (Thierry, 2009; Chow y cols., 2010 y Doorbar y cols., 2012).

Por su parte, la proteína secundaria de la cápside L2 es más variable entre los distintos tipos de VPH. La transcripción de las regiones tardías estaría influida por reguladores celulares, los cuales se encuentran sólo en las capas superiores e intermedias del epitelio escamoso (Thierry, 2009 y Doorbar y cols., 2012).

Además de estas dos regiones, todos los VPH poseen una región de control larga no codificante URR o long control region (LCR), que separa los ORF tempranos y tardíos, la cual contiene secuencias de control de la transcripción e inicio de la replicación (Doorbar y cols., 2012).

1.2.3 COCE Y SU ASOCIACIÓN CON VPH

La asociación entre la presencia de VPH-16 y VPH-18 con el desarrollo de CCU, así como con el cáncer anal, ha sido claramente demostrada, además es sabido que la transmisión del VPH estaría asociada a conductas sexuales (Herrero y cols., 2003). En este sentido, se ha sugerido que ciertas prácticas sexuales, como el sexo oral (contacto oral-genital y/o oral-anal) y ciertas conductas sexuales (como tener múltiples parejas sexuales) favorecen la entrada del virus a la cavidad oral y en esta localización podría participar en la iniciación, promoción o progresión tumoral (D'Souza y cols., 2010). Otros estudios hablan de la transmisión desde el tracto genital materno a través de micro fisuras en membranas fetales o vía sanguínea a través de la placenta (Syrjänen, 2010).

Según lo reportado en la literatura la media de edad de los pacientes con cáncer asociado a VPH es menor de 60 años y las muestras suelen ser pobremente diferenciadas al examen histológico (Rautava, 2012). Algunos estudios señalan que la lengua es la ubicación más frecuente del COCE VPH positivo y que estaría más asociado a pacientes jóvenes (da Silva y cols., 2007 y Salem, 2010).

Si bien, es más común la detección del VPH en los carcinomas orofaríngeos y en menor frecuencia en los carcinomas orales, hasta ahora una eventual función etiológica del VPH en el desarrollo de COCE ha sido muy controversial, ya que los datos en la literatura muestran tasas de infección por VPH muy variables en COCE (Herrero y cols., 2003 y Campisi y cols., 2007). Estas varían desde un 0% a un 45% (Zhang y cols., 2004; Nemes y cols., 2006; Lingen y cols., 2013; Kruger y cols., 2014). Dicha variabilidad puede ser atribuible a los procesos de fijación del tejido biopsiado, al almacenamiento de las muestras, la extracción de ADN, la etnicidad y la geografía (Kreimer y cols., 2005; Jordan y cols., 2012); pequeño número de muestras analizadas; posible contaminación; técnica utilizada para la detección del virus y el sitio de COCE analizado (Ha, 2004). La literatura señala que el VPH en COCE es relativamente bajo comparado con carcinomas orofaríngeos (Gillison y cols., 2008;

Pannone y cols., 2011; Fronie y cols., 2013). StGuily y cols., sostienen que la prevalencia del VPH en COCE es de un 10,5% (StGuily y cols., 2011). Un meta-análisis realizado en el 2001 informó que el VPH estaba presente en el 46,5% de los COCE analizados, sin embargo, a diferencia de los CEC orofaríngeos VPH positivos, la asociación causal entre VPH-16 y otros genotipos de alto riesgo con COCE es débil y la naturaleza de la asociación no está clara (Miller, 2001). Todo lo anterior nos indica que si bien existen estudios que demuestran asociación, aún no se encuentra relación de causalidad.

1.2.4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA

La vía de señalización Wnt involucra genes altamente conservados de proteínas secretoras entre cuyas funciones biológicas destaca el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Dale, 1998). Hasta la fecha, se han reconocido tres vías distintas que desempeñan funciones de la vía Wnt: la vía canónica o Wnt/ β -catenina, la vía de la polaridad celular planar y la vía Wnt dependiente de Ca^{2+} (Munemitsu y cols., 1995). La vía canónica o Wnt/ β -catenina está regulada por los niveles intracelulares de la proteína β -catenina (Orford y cols., 1997 y Takahashi-Yanaga, 2007), la cual además de ser una molécula efectora de la señal de activación Wnt, es una proteína involucrada en la adhesión celular junto a E-cadherina. En ausencia de las señales de Wnt, β -catenina está destinada a la degradación vía proteosoma, mediante la fosforilación a través de un complejo multiproteico formado por una quinasa serina / treonina, glucógeno sintasa quinasa 3b (GSK-3b) y un producto del gen supresor de tumor, la Poliposis Adenomatosa Coli (APC) (Takahashi-Yanaga, 2007; Reya, 2005). La elevación citoplasmática de los niveles de la proteína β -catenina es consecuencia de la activación de la vía de señalización Wnt. La activación de la vía se inicia con la secreción de proteínas Wnt y su unión a los receptores de superficie celular Frizzled (Fzd). La activación del receptor Fzd recluta a la proteína Dishevelled (Dvl) la cual bloquea al complejo proteico citoplasmático encargado de la degradación de la proteína β -catenina. En el núcleo, los genes diana

de la vía de señalización Wnt son normalmente inhibidos por un complejo proteínico que incluye al Factor Estimulador Linfoide (LEF) y al factor de células T (LEF-1/ TCF) unidos a la proteína co-receptora Groucho (GRG). La inhibición de la degradación de β -catenina ocasionada por el ligando Wnt da como resultado la acumulación de dichas proteínas citoplasmáticas y su posterior translocación al núcleo para formar un complejo con LEF-1/TCF que desplaza a la proteína Groucho y adopta la función de co-activador al inducir la transcripción de los genes diana de la vía Wnt, relacionados con el crecimiento y la proliferación celular (Ochoa-Hernández, 2012; Luu y cols., 2004). Por lo tanto, si esta vía tiene alteraciones en su funcionamiento, puede llevar a un crecimiento celular descontrolado y a la formación de tumores (Figura 2).

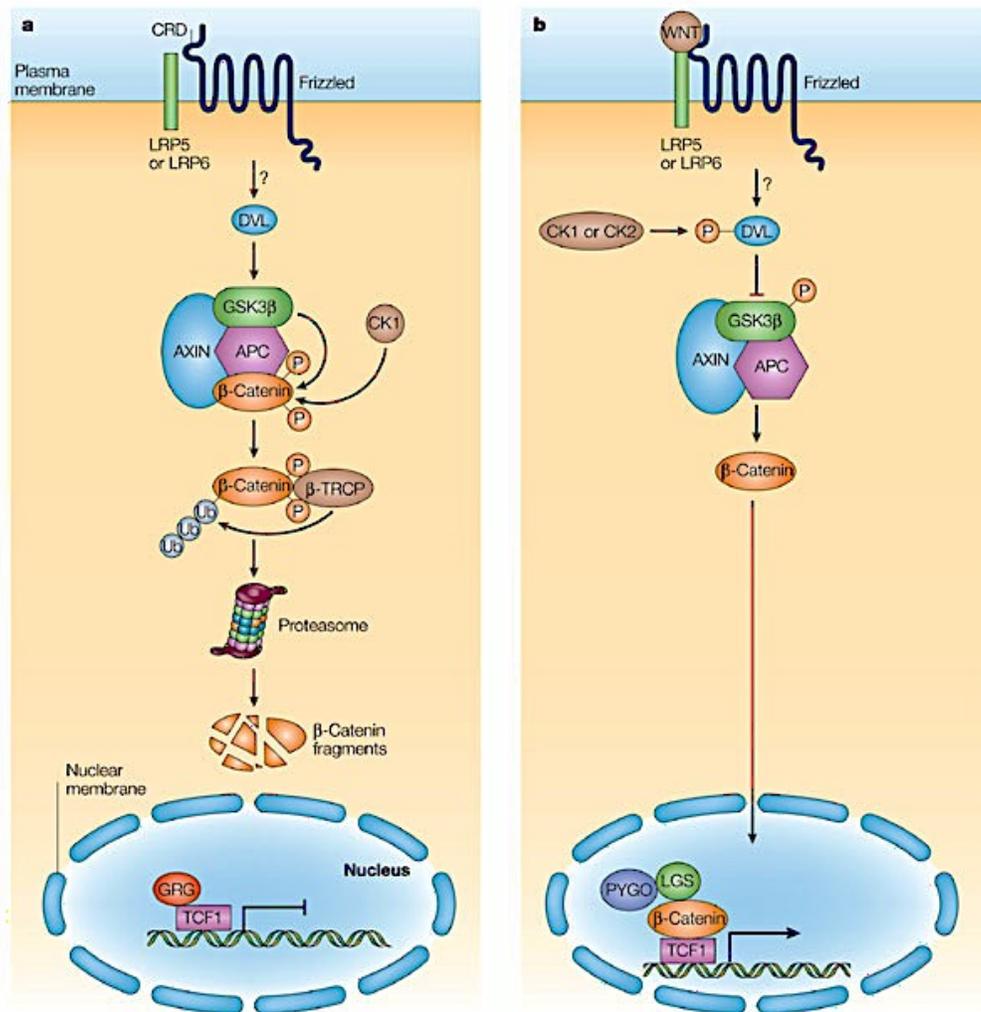


Figura 2: Vía canónica de Wnt (Staal F. y cols., 2005).

La estabilización de β -catenina es un evento temprano en la carcinogénesis. Varios reportes han demostrado la activación aberrante de la vía de señalización Wnt en diferentes tumores humanos, como el colorrectal, gástrico y melanoma, por lo tanto hay evidencia considerable de anomalías en la vía de señalización Wnt en tumorigénesis (Gonzalez-Moles y cols, 2010; Warnakulasuriya, 1995).

1.2.5 VÍA WNT Y CÁNCER CERVICAL

Diferentes mutaciones en varios componentes de esta vía han sido estudiadas e identificadas en la mayoría de los tumores humanos, entre ellas mutaciones en APC y en el gen que codifica β -catenina, *CTNNB1*. En CCU estudios han mostrado el papel que tiene la activación de la vía de Wnt/ β -catenina en su patogénesis. Oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR producen una expresión nuclear de β -catenina en muestras de CCU VPH positivas (Pérez y cols., 1995).

En este aspecto, se ha sugerido que la transformación de queratinocitos humanos inmortalizados por VPH requiere un segundo proceso de activación hacia la malignidad, y esto puede ser llevado a cabo gracias a la activación de la vía canónica de Wnt. Esto sugiere que la acumulación de β -catenina se puede ejecutar en un nivel superior de la vía de señalización; por ejemplo, inactivación de reguladores negativos como APC o axina. Está bien establecido que durante el proceso de carcinogénesis distintos genes supresores de tumores son inactivados por metilación anormal de las islas CpG, probablemente debido a un incremento en la actividad de ADN metiltransferasas (DNMT). E7 de VPH-16 tiene la capacidad de unirse e incrementar la actividad de la DNMT1, que es la enzima responsable de adicionar grupos metilo a las islas CpG; de esta manera, resulta factible que reguladores negativos de la vía Wnt/ β -catenina pudieran ser inactivados por un proceso de metilación. En este contexto, los genes sFRPs, axina, DICKKOPF (Dkk) y APC tienen islas CpG enriquecidas en sus promotores, los cuales pueden estar hipermetilados en algunas neoplasias incluyendo CCU; por lo tanto, estos genes serían inactivados por metilación en sus promotores durante la carcinogénesis cervical (Pérez y cols., 1995).

Los mecanismos virales involucrados en la carcinogénesis han sido estudiados profundamente, entregando suficiente evidencia para postular la existencia de tres eventos importantes en el desarrollo de un tumor invasor: la integración del ADN viral al genoma del hospedero, la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 y finalmente la compleja red de interacciones entre E6/E7 con proteínas celulares (Rampias y cols., 2010).

Actualmente, la literatura señala que E6 y E7 interactúan con una gran cantidad de proteínas celulares que participan en vías moleculares involucradas en la activación y establecimiento del fenotipo maligno, como son p53, p16 y pRb (Boulet y cols., 2007).

1.2.6 WNT/ β -CATENINA Y CÁNCER ORAL

Rampias y cols., han demostrado una sobreexpresión de β -catenina en muestras de cáncer orofaríngeo VPH positivos, implicando un mecanismo común de regulación de niveles de β -catenina mediante oncoproteínas E6 y E7 en neoplasias asociadas a VPH (Rampias y cols, 2010), sin embargo, no existen estudios en COCE al respecto.

1.2.7 ARGUMENTO DEL PROBLEMA

Considerando que la vía Wnt/ β -catenina está involucrada en la transformación maligna tanto en CCU como cáncer orofaríngeo infectados por VPH-AR mediante una expresión nuclear de β -catenina, cabe preguntarnos si este evento también se encuentra en muestras de COCE VPH positivas. Así, β -catenina podría ser un potencial biomarcador para distinguir casos de COCE VPH positivos versus VPH negativos a través de inmunohistoquímica y orientar de esta manera, el pronóstico de los pacientes afectados.

2. HIPÓTESIS.

Existe expresión nuclear de β -catenina en muestras de COCE VPH-AR positivas en comparación a muestras de COCE VPH negativas.

3. OBJETIVO GENERAL.

Asociar expresión nuclear de β -catenina y presencia de VPH – AR en COCE.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Determinar presencia de VPH-AR en COCE.
- 2) Determinar expresión nuclear de β -catenina en COCE.
- 3) Comparar expresión nuclear de β -catenina en COCE VPH positivo versus VPH negativo.
- 4) Describir aspectos clínico-demográficos y anátomo-patológicos de los casos de COCE en estudio.

5. METODOLOGÍA.

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo observacional analítico de corte transversal.

5.2 FUENTE DE INFORMACIÓN

La fuente de información fueron las fichas clínicas y biopsias en bloques de parafina del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (SAP-FOUCH), entre los años 2000-2014.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y el Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

5.3.1 Selección de la muestra

A través de la base de datos del SAP-FOUCH, se seleccionaron las fichas clínicas de pacientes entre los años 2000 y 2014 con diagnóstico histopatológico de COCE según la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1998. Todos los diagnósticos histopatológicos fueron reevaluados previo a la inclusión definitiva.

5.3.2 Criterios de inclusión

- Biopsias con diagnóstico histopatológico de COCE, confirmado por un histopatólogo bucal.
- Cantidad suficiente de material fijado e incluido en bloques de parafina que permitiera hacer los análisis del estudio.

5.3.3 Criterios de exclusión

- Muestras que tuviesen artefactos de técnica quirúrgica y/o de procesamiento histológico.
- Muestras que fueran recidivas de la lesión inicial.
- Muestras en las que no se detectara el gen β -globina mediante PCR.

5.3.4 Tamaño de la muestra

Correspondió a un muestreo de tipo no probabilístico por conveniencia. Se estimó una muestra de 60 casos con diagnóstico de COCE, considerando un nivel de significancia del 95%, un nivel de precisión de un 3% y una proporción esperada de pérdidas de un 15%.

5.4 PROCEDIMIENTO

5.4.1 Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH

La búsqueda se realizó a través del diagnóstico histopatológico consignado en la base de datos con el programa Microsoft®Access2013, entre 2000 y 2014 utilizando como palabras claves:

- Carcinoma oral de células escamosas.
- Carcinoma Espino Celular.
- Carcinoma Pavimentoso.
- Carcinoma Escamoso.

De la misma base de datos se obtuvieron los antecedentes clínicos de cada caso recuperado, además del número de ficha clínica y placa histológica correspondiente.

5.4.2 Recopilación de datos demográficos

La información demográfica de los pacientes (género, edad y localización de la lesión) fue obtenida a partir de las fichas clínicas del SAP-FOUCH entre los años 2000 y 2014. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office.

5.4.3 Preselección de los casos registrados

La observación de los cortes histológicos de las muestras seleccionadas que cumplieron con los criterios de inclusión, fueron evaluadas por un patólogo oral con experiencia en diagnóstico histopatológico, perteneciente al Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH. Los cortes histológicos, teñidos con tinción de rutina hematoxilina-eosina (H-E), fueron observados utilizando un microscopio óptico Olympus CX21. El objetivo de esta observación fue:

- Reevaluar y confirmar el diagnóstico histopatológico de cada caso.
- Seleccionar el corte más representativo en los casos en que existía más de una placa histológica.

5.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez obtenidas las muestras en moldes de parafina, a cada uno se le realizó un corte de 10 µm con una navaja nueva para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. LeitzWetzlar y fue colocado en un tubo eppendorf debidamente rotulado con el mismo número del molde de parafina.

Amplificación de VPH genérico: Los cortes en parafina, extraídos del tubo eppendorf fueron tratados con 1mL del xilol y luego con 1 mL de etanol. Después de la centrifugación cada sedimento fue suspendido en un buffer de digestión (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 0.5% Tween 20) con 200 µg de Proteinasa K (Invitrogen) e incubado a 56°C durante 24 hrs. Posterior a esta incubación, la solución fue calentada a 100°C por 10 min y centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. Después

de una extracción con fenol/cloroformo, el ADN obtenido se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000. La amplificación del VPH con los partidores GP5+/GP6+ (Tabla 1) se realizó en una mezcla de reacción que tenía 2,5 µL de muestra (que tuvo 100 ng de ADN), 200 µM de dNTP, 0,5 µM de cada partidor y 1,0 U de Taq ADN polimerasa (Takara, Japón) en un volumen total de 25 µL de buffer (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-Cl, pH 8,3). El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95° durante 4 min; subsiguientes 45 ciclos a 95°C durante 1 min, 40°C durante 2 min y 72°C durante 1,5 min y la última extensión a 72°C durante 5 min. La amplificación de un fragmento de β-globina con un conjunto de partidores PCO3/PCO4 (fragmento de 110 pb) se utilizó como control positivo interno. El programa de PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95° C durante 4 min, 40 ciclos con el perfil de ciclos de 95°C durante 1 min, 52°C durante 1 min y 72°C durante 2 min y una extensión final de 5 min a 72°C (Aguayo y cols., 2007).

Gen	Partidores	Secuencias	pb
VPH L1	GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	150
	GP6+	5'- GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	
β-globina humana	PCO3	5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3'	110
	PCO4	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	

Tabla 1. Partidores usados para la amplificación de VPH genérico y control interno β-globina.

Amplificación de VPH-16/18: Las muestras positivas para VPH genérico fueron sometidas a amplificación de VPH-16 y VPH-18 con partidores específicos (Tabla 2), la cual se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 45 ciclos con el perfil de ciclos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 45 s y 72°C durante 45 s, y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se caracterizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3,0 % y visualización usando transiluminador UV (VilverLourmat) (Aguayo y cols., 2007).

Oligonucleótido	Secuencias	pb
VPH-16	Forward 5'-GGTCGGTGGACCGGTCGATG-3' Reverse 5'-GCAATGTAGGTGTATCTCCA-3'	96
VPH-18	Forward 5'-CCTTGGACGTAAATTTTGG-3' Reverse 5'-CACGCACACGCTTGGCAGGT-3'	115

Tabla 2. Partidores usados para amplificación de VPH 16/18

5.6 TÉCNICA IHQ PARA LA DETECCIÓN DE β -CATENINA

5.6.1 Procesamiento previo a la técnica IHQ

A cada molde seleccionado, se le realizó 1 corte de 4 μ m para cada anticuerpo, con navajas de corte para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. LeitzWetzlar. Posteriormente los cortes fueron colocados en baño de estirado marca Labline® a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos con carga positiva (Laboratorio Cellpath, Inglaterra) y secados a 60°C por 30 min en estufa marca Memmert®.

5.6.2 Técnica IHQ

Una vez completado el tiempo de secado, las muestras en cada portaobjeto fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. Las secciones se colocaron en buffer citrato de sodio (pH 6) durante 45 min en olla a presión para la recuperación antigénica, y posteriormente fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las secciones en H₂O₂ al 3% en metanol a temperatura ambiente durante 20 min. Las secciones se pre-incubaron con suero de caballo durante 20 min a temperatura ambiente y después se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a 37°C con el siguiente anticuerpo primario:

Anticuerpo Primario	Tipo de Anticuerpo	Dilución	Laboratorio Comercial	Código del Producto	Patrón de marcación
Anti- β catenina	Ac Monoclonal Murino	1:200	Biogenex	M3539	Membrana, Citoplasmática, Nuclear

Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS durante 5 min, fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado durante 20 min a 37°C y posteriormente con peroxidasa-estreptavidina conjugada (Sistema Detección Universal Vectastain Elite Kit amplio espectro ABC-HRP, RTU, Vector-USA, EE.UU.) durante 20 min a 37°C; la reacción se visualizó finalmente con diaminobencidina (DAB) y fue contrarrestada con hematoxilina de Harris (Shuyama y cols., 2007 y Kumar y cols., 2008). En el procedimiento se incluyeron controles negativos obtenidos mediante la sustitución del anticuerpo específico con PBS y un control positivo (adenocarcinoma de colon) necesarios para validar la técnica IHQ, los cuales fueron recomendados por el fabricante de dicho anticuerpo y se les aplicaron los mismos procedimientos que al tejido en estudio.

5.7 RECOLECCION DE LOS RESULTADOS

5.7.1 Observación de células inmunopositivas

Para la observación de las células inmunopositivas se llevaron a cabo los siguientes pasos: las láminas teñidas se enumeraron de acuerdo al número de molde al cual pertenecían y se etiquetaron de tal forma que se especificó el anticuerpo utilizado.

Las células inmunopositivas se evaluaron microscópicamente con un aumento de 40x.

La localización de β -catenina se clasificó en membrana, citoplasma y nuclear, dependiendo del patrón de inmunolocalización.

La intensidad de la tinción en membrana se clasificó en leve, moderada o intensa. En casos no homogéneos, se registró la intensidad predominante (más del 70% de las células).

La tinción citoplasmática se registró como positiva o negativa. Se consideró positiva cuando se observó una marcación de color pardo a nivel citoplasmático en más del 70% de las células, sin considerar intensidad.

La marcación nuclear se evaluó como positiva para la proteína de β -catenina en el caso de contar con una marca de color pardo en el núcleo en más del 70% de las células epiteliales, sin considerar intensidad.

Dos operadores realizaron la observación de las células inmunopositivas, cada uno realizó la observación completa del anticuerpo testeado. Se realizó una calibración intra-observador mediante coeficiente de correlación de Pearson el cual mostró un valor de 0,99. La observación de estos cortes fue realizada en el Área de Anatomía Patológica, Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

5.8 VARIABLES DEL ESTUDIO

1. Presencia o ausencia de VPH: COCE VPH 16/18 positivo
COCE VPH 16/18 negativo

2. Inmunotinción de β -catenina: Se consideraron tres patrones de inmunotinción para β -catenina: membrana, citoplasma y núcleo. Cuando se observó una marcación de color pardo a nivel de membrana, citoplasma y núcleo respectivamente.

5.9 CONTROLES DE CALIDAD

La amplificación del fragmento del gen β -globina con un conjunto de primarios PCO3/PCO4 (Figura 3) se utilizó como control positivo interno en todas las muestras de COCE que entraron al estudio para descartar que el ADN extraído desde el tejido fijado e incluido en parafina no fuera el adecuado para la amplificación por PCR, ya sea por fraccionamiento o degradación que sufre el ADN durante el proceso de fijación. Sólo las muestras que fueron positivas para la amplificación de β -globina fueron sometidas posteriormente a la detección de VPH genérico.

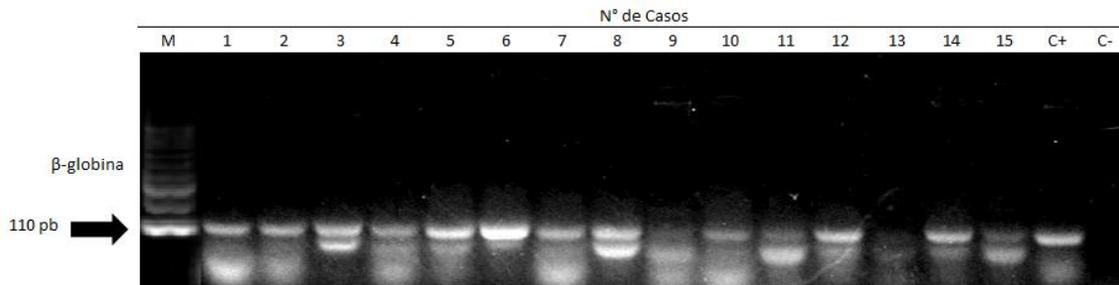


Figura 3. Imagen representativa de los casos estudiados. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de amplificación (PCR) de un fragmento del gen β -globina humana. Carriles 1-15: Ejemplos representativos de algunas muestras clínicas. M: marcador de peso molecular, C-: control negativo (H₂O), C+: control positivo (línea celular SiHa).

Se procedió a realizar un control positivo recomendado por el fabricante para el anticuerpo utilizado, con el fin de validar tanto la calidad del mismo como la técnica IHQ.

Para la demostración del antígeno de β -catenina a través de IHQ se utilizó muestras de adenocarcinoma de colon (Figura 4.1), adicionalmente se realizó IHQ para la demostración del antígeno citoqueratina, utilizando el anticuerpo anti-pancitoqueratina AE1/AE3 en todas las muestras de COCE del estudio como control positivo interno, con el fin de descartar problemas de fijación, como se muestra en la Figura 4.2.

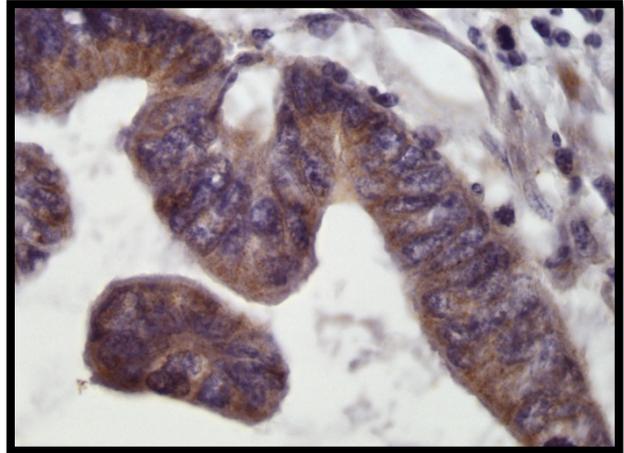
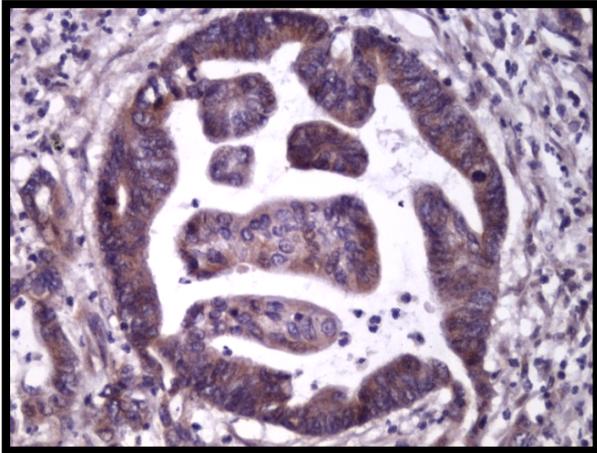


Figura 4.1. Inmunohistoquímica empleando anticuerpo anti β -catenina. Cortes de control positivo de Adenocarcinoma de Colon. Se observa marcación citoplasmática intensa en todas las células epiteliales neoplásicas, y ocasionalmente marcación nuclear. Aumento 10x, 40x.

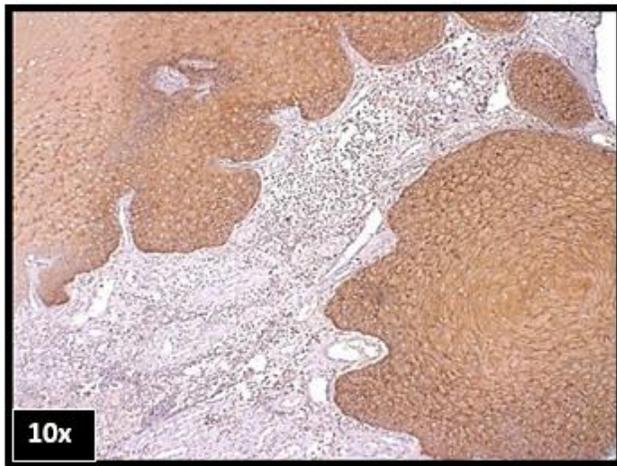


Figura 4.2. Expresión citoplasmática de citoqueratina para las muestras de COCE del estudio a través de IHQ utilizando anticuerpo anti-citoqueratina AE1/AE3.

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante análisis de normalidad de la curva a través de la prueba de Shapiro Wilk.

Para determinar diferencias de género, edad y grado de diferenciación histológica entre las muestras de COCE VPH- AR y VPH negativas se utilizó el test exacto de Fisher.

Para determinar la asociación que existía entre la presencia de VPH- AR con la presencia de β -catenina en COCE se utilizó el test de Mann-Whitney. Se consideró un valor de significancia menor del 5% ($p < 0,05$) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el software Stata 11.0.

6. RESULTADOS

6.1 DETERMINAR LA PRESENCIA DE VPH-AR EN COCE

De un total de 60 casos analizados a través de PCR convencional, 8 casos (13.3%) resultaron positivos en la detección de VPH genérico utilizando los partidores GP5+/GP6+. De estos 8 casos con presencia de VPH genérico, el 100% resultó positivo para la detección de VPH 16/18. De los 8 casos positivos para VPH 16/18, 5 fueron VPH-16 (63%) y 3 fueron VPH-18 (37%). Al estudiar la presencia del virus en la totalidad de los casos de COCE analizados podemos observar que el VPH 16/18 se encuentra en un 13.33% del total de los 60 casos de COCE, un 8.33% corresponde a VPH-16 y un 5% a VPH-18. 52 casos (86.6%) resultaron negativos para la detección de VPH genérico del total de casos estudiados (Tabla 3). En la Figura 7 se muestra una imagen representativa de los productos de PCR de los casos de COCE analizados.

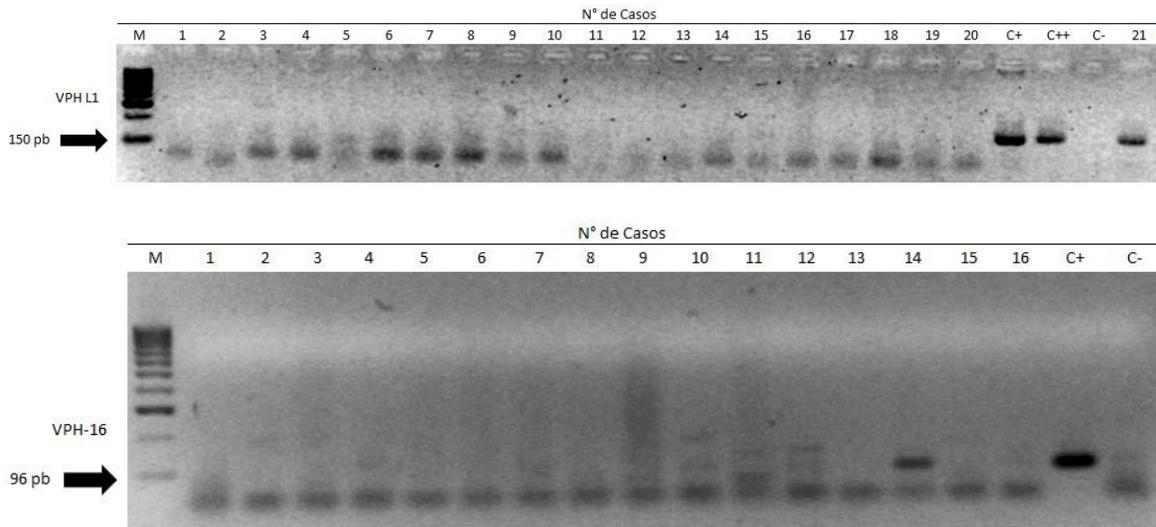


Figura 5. Imagen representativa de los casos estudiados. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de amplificación (PCR) de un fragmento del gen L1 de VPH (A) y E6 de VPH-16 (B). A: Carriles 1-21: tejidos de COCE, M: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+, C++: controles positivos. B: Carriles 1-16: tejidos de COCE, M: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+: control positivo.

Tabla 3. Detección de VPH en las muestras de COCE

VPH Genérico	n°	%
Total de muestras analizadas	60	100
Casos negativos para VPH genérico	52	86.6
Casos positivos para VPH genérico	8	13.3
Casos positivos para VPH genérico		
Total	8	100
VPH 16/18	8	100
Casos positivos para VPH 16/18		
Total	8	100
VPH-16	5	63
VPH-18	3	37

6.1.1 Caracterización de las muestras de COCE en ausencia y presencia de VPH 16/18

Las características clínico-patológicas de las muestras de COCE según presencia y ausencia de VPH 16/18 se pueden apreciar en la Tabla 4.

De las 60 muestras analizadas de COCE, 26 fueron mujeres, y de éstas 4 fueron positivas para VPH 16/18, lo que representa el 15.3% del total de mujeres de las muestras analizadas con COCE; del mismo total de muestras analizadas 34 fueron hombres, de los cuales 4 fueron VPH 16/18, lo que representa el 11.7% del total de hombres con COCE.

Existió el mismo número de hombres y mujeres en el total de las muestras de pacientes con COCE VPH 16/18, con un total de 4 mujeres y 4 hombres, en comparación al total de las muestras de pacientes con COCE VPH negativo en donde la proporción de hombres respecto de mujeres fue levemente mayor, con un total de 30 (88.3%) hombres y 22 (84.7%) mujeres. La edad promedio de los pacientes con COCE VPH 16/18 fue de 64,1 (DS:11,2), mientras que el promedio de edad de los

pacientes VPH negativo que fue de 64.6 (DS:13,4). Sólo 2 casos VPH 16/18 fueron de pacientes menores de 60 años, ambos fueron hombres.

Las muestras fueron clasificadas histológicamente según grado de diferenciación; de las 60 muestras de COCE analizadas, 34 fueron clasificadas como bien diferenciadas, de este grupo 2 muestras (5.8%) fueron VPH 16/18 y 32 (94.1%) muestras fueron VPH negativo. 23 muestras del total de casos de COCE fueron clasificadas como moderadamente diferenciadas, de las cuales 5 (21.7%) fueron VPH 16/18 y 18 muestras (78.2%) fueron VPH negativo. Del total de muestras de COCE, 3 muestras fueron clasificadas como COCE pobremente diferenciado, de las cuales 1 (33.3%) muestra fue VPH 16/18 y 2 muestras (66.6%) fueron VPH negativo.

Tabla 4. Características clínico-patológicas de las muestras de COCE

	Total de casos	VPH Negativo	VPH 16/18	Valor p
	N (%)	N (%)	N (%)	
Total	60 (100%)	52 (86.6%)	8 (13.3%)	
Género				
Mujer	26 (100%)	22 (84.7%)	4 (15.3%)	0.48
Hombre	34 (100%)	30 (88.3%)	4 (11.7%)	
Edad				
<60	20 (100%)	18 (90%)	2 (10%)	
≥60	37 (100%)	31 (83.7%)	6 (16.2%)	0.46
s/i	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	
Grado de diferenciación				
Bien diferenciado	34 (100%)	32 (94.1%)	2 (5.8%)	
Moderadamente diferenciado	23 (100%)	18 (78.2%)	5 (21.7%)	0.11
Pobremente diferenciado	3 (100%)	2 (66.6%)	1 (33.3%)	

*s/i: sin información

En cuanto a la localización de las lesiones, fue un dato que en la gran mayoría de los casos no se pudo obtener, ya que esa información no se encontró en las fichas clínicas. Sin embargo, la recopilación de la información de sólo los 8 casos VPH 16/18 se puede encontrar en la Tabla 5, en donde se puede observar que la localización más frecuente de las lesiones se encuentra en igual proporción en lengua que en reborde. En dos casos no fue posible obtener esa información.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de las muestras de COCE VPH 16/18

Caso	Edad	Sexo	Localización de la lesión	Grado de diferenciación	VPH
1	75	F	Lengua	Moderadamente diferenciado	16
2	68	M	Lengua	Bien diferenciado	16
3	51	M	*s/i	Bien diferenciado	16
4	60	F	Reborde	Moderadamente diferenciado	16
5	61	F	*s/i	Moderadamente diferenciado	16
6	48	M	Lengua	Pobremente diferenciado	18
7	70	M	Reborde	Moderadamente diferenciado	18
8	80	F	Reborde	Moderadamente diferenciado	18

*s/i: sin información

6.3 Determinar la expresión de β -catenina en COCE

La localización de β -catenina en el epitelio de todas las muestras de mucosa oral normal (MON), fue exclusivamente en membrana celular y no se observó tinción citoplasmática y/o nuclear (Figura 6). Por otro lado, todas las muestras de COCE independiente a la presencia del virus tuvieron tinción citoplasmática para β -catenina.

La expresión de β -catenina en la membrana de todas las muestras fue positiva y su intensidad tendió a decrecer en la medida que disminuyó el grado de diferenciación celular, llegando usualmente a perderse en los estratos superiores del epitelio. En cuanto a la intensidad de tinción de membrana 27 muestras resultaron de intensidad débil, 3 muestras VPH positivas y 24 VPH negativas. De las 3 muestras VPH positivas 1 correspondía a COCE bien diferenciado (COCE-BD) y 2 a COCE moderadamente diferenciado (COCE-MD). Por otra parte de las 24 muestras VPH negativas; 10 correspondieron a COCE-BD, 13 a COCE-MD y solo 1 a COCE pobremente diferenciado (COCE-PD). 34 muestras resultaron de intensidad moderada, 5 VPH positivas y 29 VPH negativas. La expresión de β -catenina en las muestras VPH negativas fue principalmente citoplasmática (figura 7). De las 5 muestras VPH positivas 1 correspondió a COCE-BD, 3 a COCE-MD y 1 a COCE-PD. En cuanto a las 29 muestras VPH negativas, 22 correspondieron a COCE-BD, 5 a COCE-MD y solo 1 a COCE-PD.

Siete muestras de COCE (11.6%) tuvieron expresión nuclear de β -catenina. De éstas, 5 (71.4%) fueron VPH positivas; 4 fueron VPH-16, con moderada o intensa expresión nuclear en más del 70% de las células; una muestra fue VPH-18 (Figura 8). Sólo 2 muestras VPH-negativas de un total de 52 tuvieron expresión nuclear de β -catenina en menos del 10% de las células. Las diferencias entre la expresión nuclear de β -catenina en muestras VPH positivas versus VPH negativas fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.0001$.

Los resultados de la localización de β -catenina en muestras VPH positivas y negativas se encuentran resumidos en tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6 : Localización de β -catenina en grupos de estudio en muestras VPH positivas.

Grupo	Casos Totales	Intensidad en tinción de membrana			Tinción Citoplasmática		Tinción Nuclear	
		Débil	Moderad o	Intenso	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
MON	3	0	0	3	0	3	0	3
COCEBD	2	1	1	0	2	0	2	0
COCEMD	5	2	3	0	5	0	3	2
COCEPD	1	0	1	0	1	0	0	1

Tabla 7 : Localización de β -catenina en grupos de estudio en muestras VPH negativas.

Grupo	Casos Totales	Intensidad en tinción de membrana			Tinción Citoplasmática		Tinción Nuclear	
		Débil	Moderado	Intenso	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
MON	3	0	0	3	0	3	0	3
COCEBD	32	10	22	0	32	0	1	31
COCEMD	18	13	5	0	18	0	1	17
COCEPD	2	1	1	0	2	0	0	2

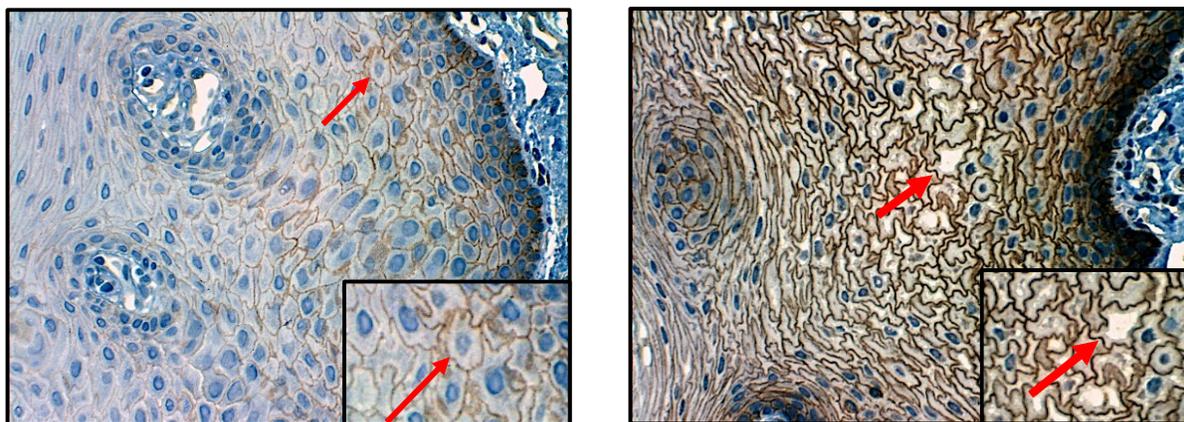


Figura 6. Localización inmunohistoquímica de β -catenina en mucosa oral normal. La tinción fue exclusivamente en membrana celular (Flechas rojas) y no se observó tinción citoplasmática y/o nuclear.

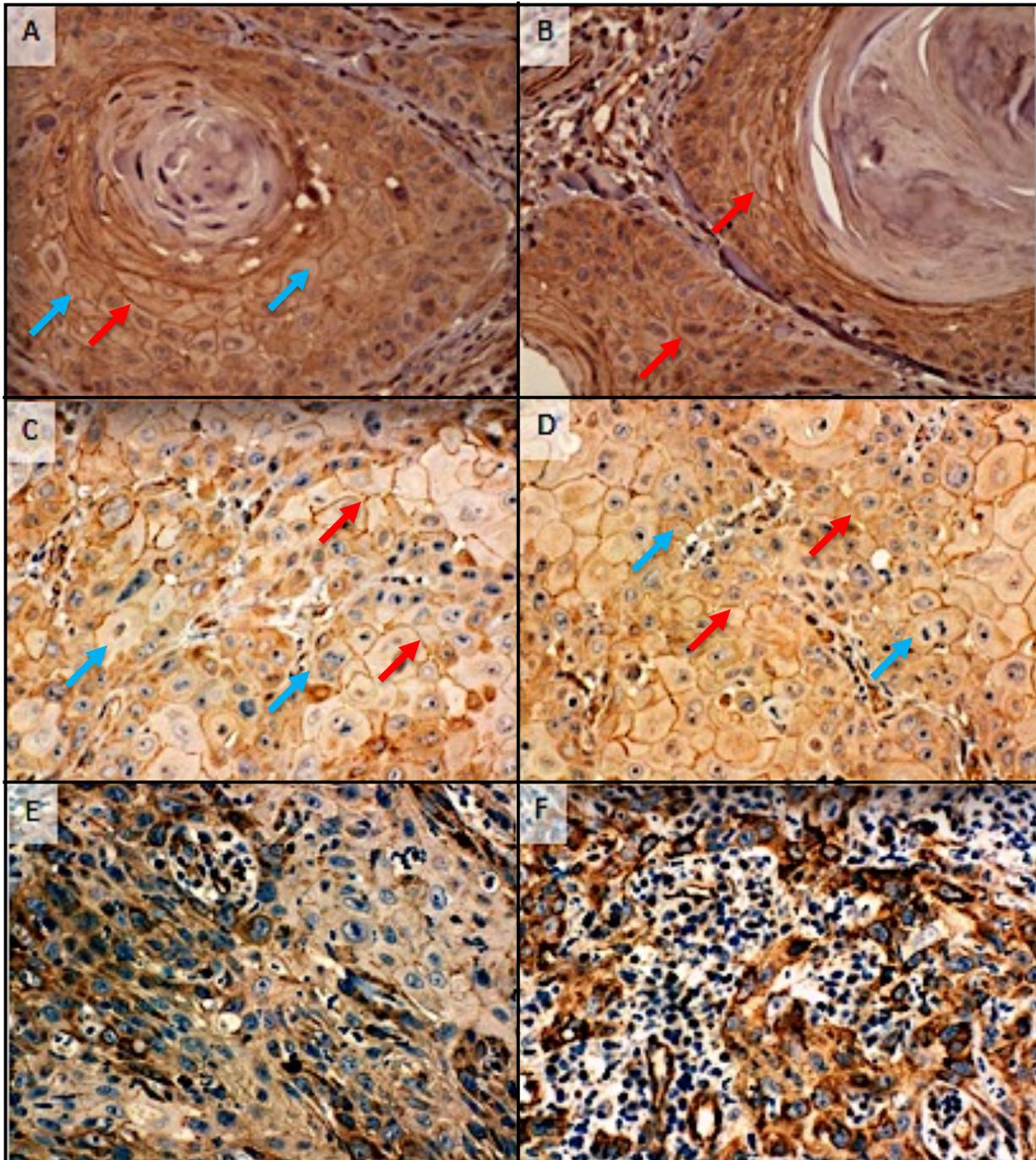


Figura 7. Localización inmunohistoquímica de β -catenina en grupos de estudio en muestras de COCE VPH negativas. COCE Bien Diferenciado (A-B); COCE Moderadamente Diferenciado (C-D); COCE Pobremente Diferenciado (E-F). Todas las muestras fueron positivas tanto para membrana (flechas rojas) como para citoplasma (flechas azules). Notar que la intensidad en membrana tendió a decrecer en la medida que disminuyó el grado de diferenciación celular (E-F).

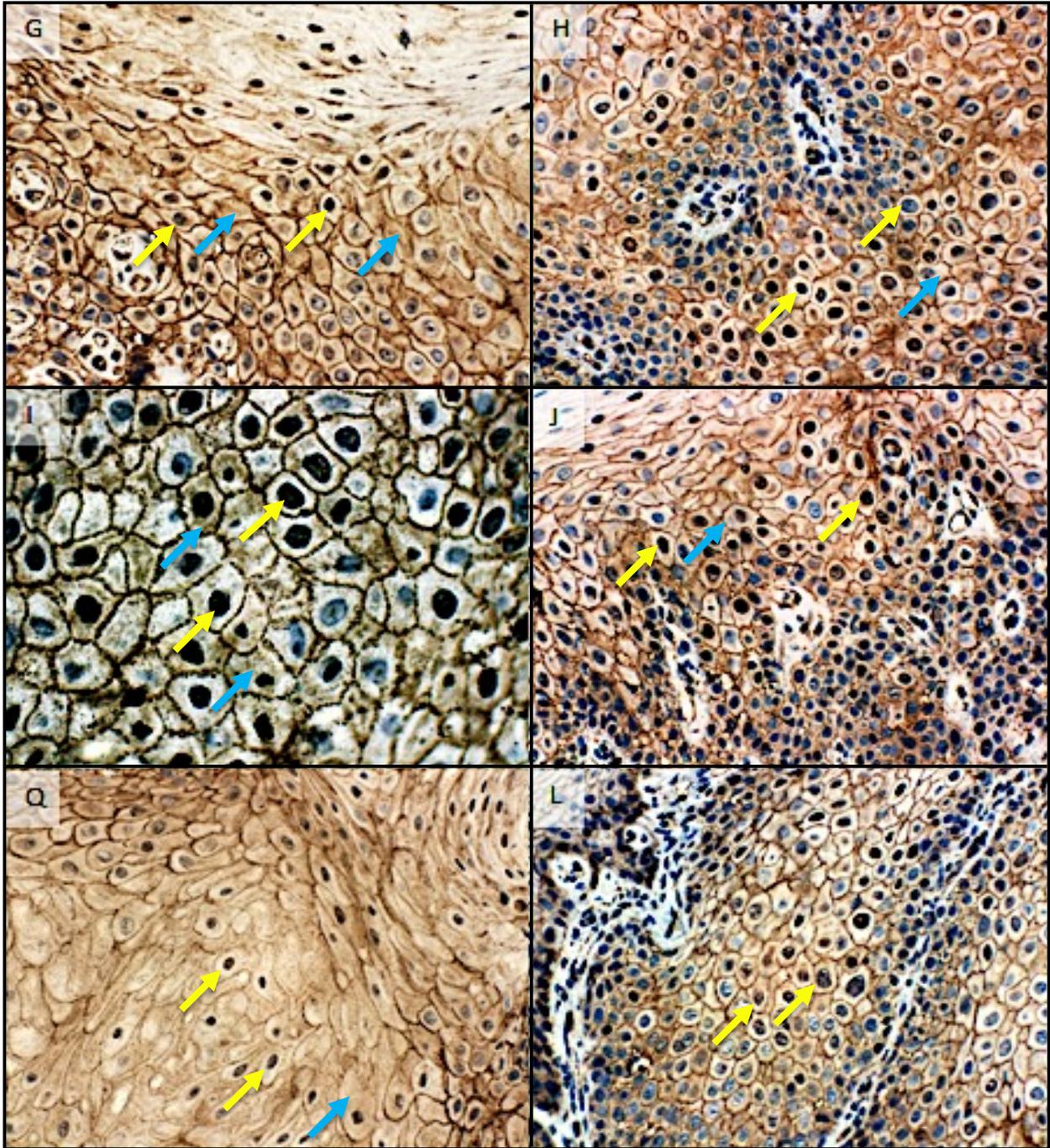


Figura 8. Localización inmunohistoquímica de β -catenina en grupos de estudio en muestras de COCE VPH positivas (G-L). β -catenina se encuentra localizada principalmente en núcleo (flechas amarillas) y citoplasma (flechas azules).

7. DISCUSIÓN

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral. Entre los principales factores de riesgo asociados a esta patología se encuentran el tabaquismo, abuso de alcohol, bajo consumo de frutas y vegetales, bajo nivel socioeconómico y posiblemente el VPH (Conway y cols., 2008 y Scully., 2009).

El objetivo del presente estudio fue asociar la expresión nuclear de β -catenina y presencia de VPH-AR en COCE, con la hipótesis de que existe expresión nuclear de β -catenina en muestras de COCE VPH-AR positivas en comparación a muestras de COCE VPH-AR negativas.

Se detectó el ADN de VPH en 8 de 60 casos estudiados (13.3%), todos positivos para la detección de VPH 16/18. De éstos, 5 casos fueron VPH-16 y 3 casos fueron VPH-18. Los resultados reportados en la literatura informan porcentajes variables de la presencia de VPH en COCE. Syrjanen y cols., fueron los primeros en proponer la participación del VPH en la carcinogénesis del cáncer oral y orofaríngeo. Sus resultados mostraron que el 40% de los cánceres orales y de laringe tenían similitudes histológicas y morfológicas con lesiones infectadas por el VPH y que al ser estudiadas mediante técnicas de IHQ, el 50% de las muestras expresaban proteínas asociadas a la infección viral (Syrjanen y cols., 1983).

Si bien, es más común la detección del VPH en carcinomas orofaríngeos y en menor frecuencia en carcinomas orales, hasta ahora una eventual función etiológica del VPH en el desarrollo de COCE ha sido muy controversial, ya que los datos en la literatura muestran tasas de infección por VPH muy variables en COCE (Herrero y cols., 2003; Campisi y cols., 2007). Estas varían desde un 0% a un 45% (Zhang y cols., 2004; Nemes y cols., 2006; Lingen y cols., 2013; Kruger y cols., 2014). Dicha variabilidad puede ser atribuible a distintos factores (Kreimer y cols., 2005 ; Jordan y cols., 2012). St Guily y cols., en su estudio realizado en Francia de 523 casos de los cuales el 60% eran carcinomas orofaríngeos y el 40% carcinomas orales, encontraron una

prevalencia del VPH en COCE de un 10,5% (St Guily y cols., 2011) y junto con Syrjanen y cols., señalan que VPH-16 es el genotipo más prevalente (Syrjanen y cols., 2011). Así, los resultados de nuestro estudio concuerdan con la literatura actual, ya que se encontró la presencia del VPH-AR en un 13.3% de los casos estudiados, siendo el genotipo más prevalente el 16, encontrándose en un 63% de los casos VPH positivos. Similar resultado muestra la revisión sistemática realizada por Kreimer y cols., en donde señala al genotipo VPH-16 como predominante en un 68% de las muestras de COCE VPH positivo. En dicho estudio, se estudiaron 5.046 muestras de carcinoma espinocelular de cabeza y cuello, pertenecientes a 60 estudios hechos en distintos continentes y se encontró una prevalencia mayor de VPH en COCE que en nuestro estudio, con un 23,5% (Kreimer y cols., 2005). Por otro lado, un meta-análisis realizado en el 2001 utilizando datos de 94 reportes que estudiaron 4.680 muestras de COCE, informó que el VPH estaba presente en el 46,5% de los COCE analizados. Sin embargo, a diferencia de los CEC orofaríngeos VPH positivos, la asociación causal entre VPH-16 y otros genotipos de alto riesgo con COCE es débil y la naturaleza de la asociación está aún por aclarar (Miller, 2001).

Respecto del género, los resultados de nuestro estudio, al igual que los de Syrjanen y cols., mostraron que la mayoría de los casos VPH-AR (16/18) de la muestra analizada, ocurrieron en mujeres (15.3%). Sin embargo, no se observó significación estadística entre el género y la presencia de VPH, como tampoco en lo referente a la edad ni al grado de diferenciación histológica. Esto puede deberse al reducido número de muestras VPH positivas presentes en el estudio lo que hace difícil establecer algún tipo de asociación. Sin embargo, lo reportado en la literatura señala que la edad media de los pacientes con cáncer asociado a VPH es menor de 60 años y las muestras suelen ser pobremente diferenciadas al examen histológico (Rautava y Syrjanen, 2012). En cuanto a la localización, las lesiones se presentaron en igual proporción en lengua y reborde, sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que en dos casos no fue posible obtener dicha información. En este sentido, algunos estudios señalan que la lengua es la ubicación más frecuente del COCE VPH positivo (da Silva y cols., 2007; Salem, 2010), sin embargo, esto no pudo ser confirmado en este estudio.

La vía de señalización Wnt involucra genes altamente conservados de proteínas secretoras entre cuyas funciones biológicas destaca el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Dale,1998). En la mayoría de los tumores humanos se han estudiado e identificado diferentes mutaciones en varios componentes de esta vía, como APC y *CTNNB1*. Otros estudios han mostrado el papel que tiene la activación de la vía Wnt/ β -catenina en la patogénesis del CCU. Oncoproteínas E6 y E7 en VPH-AR producen una sobreexpresión nuclear de β -catenina en muestras de CCU VPH positivas (Pérez y cols.,1995).

La vía Wnt/ β -catenina juega un rol crítico en el desarrollo de muchas neoplasias, lo cual hizo preguntarnos si existe expresión nuclear de β -catenina en muestras de COCE, ya que esta molécula no solo es fundamental para la adhesión celular, sino que también juega un rol importante en la inducción de la proliferación celular. Se ha sugerido que la transformación de queratinocitos humanos inmortalizados por VPH requiere un segundo proceso de activación hacia la malignidad, y esto puede ser llevado a cabo gracias a la activación de la vía canónica de Wnt. Esto sugiere que la acumulación de β -catenina se puede ejecutar en un nivel superior de la vía de señalización, por ejemplo, inactivación de reguladores negativos como APC o axina. (Pérez y cols.,1995). Sin embargo, su expresión en COCE ha sido poco investigada.

La mayoría de los estudios de β -catenina en COCE se centran en su expresión como componente del sistema de adhesión celular y por lo tanto en su detección membranosa, ya que se ha encontrado una relación entre la expresión membranosa de β -catenina y el grado de diferenciación celular (Lo Muzio L y cols., 2009), en donde la disminución de la expresión membranosa de esta proteína ha sido asociada con pérdida de la diferenciación celular (Laxmidevi LB y cols., 2010). Williams y cols., mostraron que la expresión membranosa de β -catenina se redujo tanto en la displasia severa como en carcinomas in situ (Williams HK y cols., 1998). Bankfalvi y cols., señalan que en áreas examinadas de mucosa displásica adyacente al tumor se relacionan con una pérdida limitada de β -catenina en membrana solo en algunos

casos (Bankfalvi A, 2002). Laxmidevi y cols., señalan que la localización membranosa de β -catenina se correlacionó con la diferenciación en el COCE, mostrando una disminución de esta proteína a menor grado de diferenciación, concordando con los resultados obtenidos por Yu y cols., Gasporoni y cols., y Bagutti y cols., (Laxmidevi LB y cols., 2010; Yu y cols., 2005; Gasporoni y cols., 2002; Bagutti y cols., 1998). El estudio de Laxmidevi y cols., también señala el hecho de que la acumulación citoplasmática puede ser atribuible a la pérdida de β -catenina en la membrana, debido a su degradación por posibles mutaciones en el gen *APC*, lo cual da como resultado la acumulación de la proteína en el citoplasma (Laxmidevi LB y cols., 2010). Por lo tanto, la reducida expresión membranosa y el aumento de la expresión citoplasmática de β -catenina podrían reflejar la naturaleza altamente agresiva e invasiva de los COCE, ya que al ser una proteína involucrada en la adhesión celular, su ausencia o disminución a nivel membranoso implica la pérdida y debilitamiento de uniones celulares y por ende aumentaría la capacidad invasiva. Sin embargo, el grado de diferenciación histológica es un parámetro al que se le otorga bajo valor pronóstico; entre las razones se incluyen el grado de subjetividad y variabilidad entre histopatólogos que realizan el diagnóstico; muestra insuficiente de tumores que muestran heterogeneidad histológica; diagnóstico basado en la morfología de las células tumorales en lugar de su comportamiento biológico y clasificación centrada en las células tumorales sin mucha consideración del microambiente en el que se encuentran (Bello IO y cols., 2010). En la actualidad el parámetro más relevante para el pronóstico de COCE es compromiso de nódulos linfáticos (Sano y cols., 2007 y Grimm, 2012).

En este estudio, todas las muestras de COCE fueron positivas tanto para la tinción de citoplasma como de membrana. Esta última presentó una menor expresión en muestras con menor grado de diferenciación celular, llegando usualmente a perderse en los estratos superiores del epitelio. Así, nuestros resultados concuerdan con que un menor grado de diferenciación en COCE es asociado a una reducción progresiva de la expresión membranosa de β -catenina. Sin embargo, la muestra es pequeña y existe una gran diferencia en el número de muestras disponibles según los 3 grados

de diferenciación, tanto para muestras VPH positivas como negativas, por lo tanto nuestros resultados no son concluyentes al respecto.

En cuanto a la expresión nuclear de β -catenina, estudios muestran un aumento de la presencia de β -catenina nuclear en displasias moderadas y severas, comparadas con mucosa oral normal, displasia leve y COCE (Ishida y cols., 2007; Reyes y cols., 2015; Sato y cols., 2002). Esto sugiere que la expresión nuclear de esta proteína en estratos basales del epitelio podría estar relacionado a proliferación celular y más importante aún, que la expresión nuclear de β -catenina en lesiones con displasia moderada y severa, podría estar involucrada en la transformación maligna hacia el desarrollo de COCE. En el presente estudio se estudiaron 60 muestras de COCE de las que 7 (11.6%) mostraron expresión nuclear de β -catenina en más del 70% de las células. 5 fueron VPH positivas, mientras que solo 2 muestras VPH-negativas tuvieron expresión nuclear de β -catenina en menos del 10% de las células. Algunos autores señalan que existe una acumulación citoplasmática y nuclear de esta proteína en el 62.5% de las lesiones displásicas inducidas en ratas (Sato y cols., 2002). Ishida y cols., indican que la expresión nuclear de β -catenina incrementa durante la progresión severa de leucoplasias orales, observando también expresión nuclear en 10 de 15 muestras de COCE y una disminución de la expresión de la proteína en membrana, lo que asociaron a invasión celular y metástasis (Ishida y cols., 2007). En este sentido existen estudios como los de Odajima y cols., y Cai y cols., que han sido capaces de establecer una relación estadísticamente significativa entre la disminución de la expresión membranosa de β -catenina con metástasis (Odajima T. y cols., 2005 y Cai Z. 2008). Ueda y cols., indican que los pacientes con COCE y ausencia o disminución de la expresión membranosa de esta proteína debiesen ser considerados como grupo de riesgo para metástasis a linfonodos y mal pronóstico (Ueda G. y cols., 2006). Freitas y cols., al contrario, concluyeron que la inmunoexpresión de β -catenina no representa una herramienta útil para determinar el potencial metastásico del COCE, pero destacan el posible rol de esta proteína en otros aspectos etiopatogénicos como proliferación celular y angiogénesis (Freitas R. y cols., 2010).

Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión nuclear de β -catenina en muestras de COCE VPH positivas, siendo el genotipo más prevalente (63% de los casos VPH positivos) el 16, concordando con la literatura disponible. En este sentido, Rampias y cols., mostraron que las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH-16 serían las implicadas en la inhibición regulación de la degradación de β -catenina vía ubiquitina-proteosoma y su consecuente translocación al núcleo (Rampias y cols., 2010). Este sería el mecanismo viral implicado en la carcinogénesis inducida por VPH.

Actualmente, la literatura señala que E6 y E7 interactúan con una gran cantidad de proteínas celulares que participan en vías moleculares involucradas en la activación y establecimiento del fenotipo maligno, como son p53, p16, pRb y Ki 67 (Boulet y cols., 2007). Estas proteínas, solo han demostrado ser efectivas para la detección indirecta de VPH en CCU y cáncer orofaríngeo, a través de inmunohistoquímica pero no se ha logrado relacionarlas con presencia o ausencia de VPH en COCE. Por ejemplo, estudios muestran un gran número de muestras de COCE positivas para p53 y Ki 67, pero los hallazgos no se asocian con la presencia de VPH (Boulet y cols., 2007; Rautava y Syrjanen, 2012; Reyes y cols., 2015). En este aspecto β -catenina podría perfilarse como un nuevo marcador inmunohistoquímico complementario, mas efectivo y que al ser detectado en muestras de COCE permitiría predecir la presencia del virus.

Reyes y cols., describen que efectivamente existe un perfil molecular distinto en muestras de COCE VPH positivas, posiblemente causado por el VPH. Sin embargo, no puede negarse la posibilidad que otros factores estén relacionados a este perfil molecular ya que la mucosa oral está expuesta a diferentes componentes como tabaco o alcohol, los que podrían provocar dichas alteraciones moleculares (Reyes y cols., 2015). A modo de ejemplo, el consumo de tabaco se ha asociado con una mayor prevalencia de infección por VPH oral en varios estudios, sugiriendo que puede aumentar la probabilidad de infectarse o la persistencia de la infección oral por VPH (Gillison y cols., 2012). Así mismo, el consumo de tabaco se ha asociado con un aumento del riesgo de muerte y progresión locoregional tanto para COCE

VPH positivo como negativo (Fakhry C y D`Souza G, 2013). Por lo tanto se debe tener en extrema consideración el hecho de que el COCE es un proceso secuencial, multifactorial con acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, metabólicas, hormonales y otras, consecutivas a la exposición de múltiples agentes carcinogénicos entre los que podríamos encontrar el VPH. (Yokota, 1993 y Haddad, 2008).

Por todo lo expuesto anteriormente se puede concluir en base a los resultados de este estudio que la expresión nuclear de β -catenina en células epiteliales en COCE, podría estar relacionado a la presencia de VPH-AR. Esto nos permite sugerir a β -catenina como un potencial marcador inmunohistoquímico complementario para la detección indirecta de VPH en COCE. Ahora bien, es importante ampliar no sólo el número de muestras analizadas, sino que también generar un consenso en relación a los métodos para detectar el VPH que puedan validar la información obtenida, así como también, obtener información sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH, todo lo cual se configura como reto a futuro para poder complementar estos resultados ya que la presencia de ADN del VPH por sí sola no es suficiente evidencia para establecer una asociación causal. Ampliar la gama de marcadores a través de IHQ de proteínas implicadas en la infección por VPH como β -catenina, contribuirá en el futuro a que la investigación en cánceres VPH positivos pueda ampliar nuestra comprensión sobre el rol etiopatogénico del VPH en COCE, ayudándonos a su vez, a predecir el eventual comportamiento y pronóstico de esta patología, permitiendo generar nuevos esquemas terapéuticos, con mejores resultados para nuestros pacientes. Además, cabe destacar que no existen estudios en este ámbito en la cavidad oral, por lo que podría abrir una línea de investigación desconocida aún.

8. CONCLUSIONES

La prevalencia del VPH-AR, específicamente VPH 16/18 en muestras de COCE fue de un 13.3%. En cuanto a la localización, las lesiones VPH-AR positivas se presentaron en igual proporción en lengua y reborde.

El genotipo VPH-16 fue el más prevalente en muestras de COCE VPH positivas. Un 11.6% de muestras de COCE mostraron expresión nuclear de β -catenina, de las cuales el 71.4% fueron VPH positivas con expresión nuclear en más del 70% de las células.

La expresión nuclear de β -catenina en células epiteliales en COCE estaría relacionado a la presencia de VPH 16/18.

Se sugiere β -catenina como un potencial marcador inmunohistoquímico complementario para la detección indirecta de VPH en COCE.

9. FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO

Nuestro estudio contó con aporte económico del proyecto *FONDECYT Na1120248*, “Función de las oncoproteínas E6 y E7 de virus papiloma humano (VPH) tipo 16 en carcinogénesis asociada a humo del tabaco: Interacción entre componentes del humo del cigarrillo y las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales orales y bronquiales y especímenes clínicos” cuyo investigador responsable es el Dr. Francisco Aguayo y co-investigador el Dr. Gonzalo Rojas.

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este trabajo formó parte del Proyecto *FONDECYT Na1120248*, “Función de las oncoproteínas E6 y E7 de virus papiloma humano (VPH) tipo 16 en carcinogénesis asociada a humo del tabaco: Interacción entre componentes del humo del cigarrillo y las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales orales y bronquiales y especímenes clínicos” cuyo investigador responsable es el Dr. Francisco Aguayo perteneciente al programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ANEXO 1).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aguayo, F., Castillo, A., Koriyama, C., Higashi, M., Itoh, T., Capetillo, M., Shuyama, K., Corvalan, A., Eizuru, Y. & Akiba, S. (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 97, 85-91.
2. Bagutti C, Speight PM, Watt FM (2002). Comparison of integrin, cad-herin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol.* 1998; 186:8-16. 40.
3. Bankfalvi A, Krassort M, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J (2002). Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 31:450-7.
4. Bankfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J (2002). Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol.* 198:343-51.
5. Bello IO, Soini Y, Salo T (2010). Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol.* Sep. 46(9):630-5.
6. Bernard, H. U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S1-6.
7. Bodily, J. & Laimins, L. A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 19, 33-39.
8. Bórquez P, Capdeville F, Madrid M, Veloso M. Cárcamo M (2011). Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral. Experiencia del Instituto Nacional del Cáncer. *Rev Chil Cir.* 63(4): 351-55.
9. Boulet, G., Horvath, C., VandenBroeck, D., Sahebali, S. & Bogers, J. (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2006-2011.
10. Cai Z, Shi X, Gao Y, Wei M, Wang C, Yu G (2008). β -catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. *Chin Med J.* 121(19):1866-70.

11. Campisi G, Giovannelli L (2009). Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol.* Mar 30;1:8.
12. Campisi, G., Panzarella, V., Giuliani, M., Lajolo, C., Di Fede, O., Falaschini, S., Di Liberto, C., Scully, C. & Lo Muzio, L. (2007). Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 30, 813-823.
13. Carvalho AL, Ikeda MK, Magrin J, Kowalski LP (2004). Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution. *Oral Oncol.* 40(1):71-6.
14. Chow, L. T., Broker, T. R. & Steinberg, B. M. (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis* 118, 422-449.
15. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM (2008). Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer.* Jun 15;122(12):2811-9.
16. da Silva, C. E., da Silva, I. D., Cerri, A. & Weckx, L. (2007). Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104, 497-500.
17. Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands (1998). *Biochem J.* 329 (Pt 2):209-23.
18. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & ZurHausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
19. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55-70.
20. D'Souza, G., Zhang, H. H., D'Souza, W. D., Meyer, R. R. & Gillison, M. L. (2010) Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer. *Oral Oncol* 46, 100-104.

21. Fakhry C, D'Souza G (2013). Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: Common questions and answers. *Oral Oncology* 49: 863–87.
22. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.
23. Freitas R; Dantas E; Borges J; Mazutti F; Fernandes R. (2010). Correlation of β -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Cir. Bras.* 25 (6).
24. Fronie, A., Bunget, A., Afrem, E., Preotescu, L. L., CorlanPuscu, D., Streba, L., Mogoanta, L. & Dumitrescu, D. (2013). Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Rom J MorpholEmbryol* 54, 343-348.
25. Gasparoni A, Chaves A, Fonzi L, Johnson GK, Schneider GB, Squier CA. (2001). Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 31:385-94.
26. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L (2012). Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA J Am Med Assoc.* 307:693–703
27. Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S. & Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 100, 407-420.
28. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M (2010). Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol.*;46(7):525-30.
29. Grimm M. (2012). Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. *ClinTranslOncol.* Nov;14(11):870- 80.
30. Goss KH, Groden J (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol.* 18: 1967-1979.

31. Ha, P. K. & Califano, J. A. (2004). The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 188-196.
32. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer (2008). *N Engl J Med*. 359(11):1143-54.
33. Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M. J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F. X., Reidel, U., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Viscidi, R., Munoz, N. & Franceschi, S. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95, 1772-1783.
34. Hicks WL Jr, Loree TR, Garcia RI, Maamoun S, Marshall D, Orner JB. (1997) Squamous cell carcinoma of the floor of mouth: a 20 year review. *Head Neck*. 19:400-5.
35. Hsieh TY, Chang KP, Lee SS, Chang CH, Lai CH, Wu YC, Huang SH, Lai CS, Lin SD (2012). Free flap reconstruction in patients with advanced oral squamous cell carcinoma: analysis of patient survival and cancer recurrence. *Microsurgery*. 32(8):598-604.
36. Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M (2007). Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer*. 6:62.
37. Jadhav KB and Gupta N (2013). Clinicopathological Prognostic Implicators of Oral Squamous Cell Carcinoma: Need to Understand and Revise. *N Am J Med Sci*. 5(12): 671–679.
38. Jordan, R. C., Lingen, M. W., Perez-Ordóñez, B., He, X., Pickard, R., Koluder, M., Jiang, B., Wakely, P., Xiao, W. & Gillison, M. L. (2012). Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J SurgPathol* 36, 945-954.
39. Kirita T, Okabe S, Izumo T, Sugimura M (1994). Risk factors for the postoperative local recurrence of tongue carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 52(2):149-54.

40. Köhler HF, Kowalski LP (2012). Prognostic impact of the level of neck metastasis in oral cancer patients. *Braz J Otorhinolaryngol.* 78(6):15-20.
41. Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P. & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 467-475.
42. Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Worden, F. P., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., Urba, S. G., Chepeha, D. B., Teknos, T. N., Eisbruch, A., Tsien, C. I., Taylor, J. M., D'Silva, N. J., Yang, K., Kurnit, D. M., Bauer, J. A., Bradford, C. R. & Carey, T. E. (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J ClinOncol* 26, 3128-3137.
43. Laxmidevi LB, Angadi PV, Pillai RK, Chandreshekar C (2010). Aberrant beta-catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Sci.* 52:633-40.
44. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 11(1):9-22.
45. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM (2001). Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 15;92(4):805-13.
46. Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P (2009) beta and gamma-catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncol.* 45:501-4.
47. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W (2004). Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets.* 4(8):653-71.
48. Miller, C. S. & Johnstone, B. M. (2001). Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91, 622-635.

49. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*.92(7):3046-50.
50. Neville BW, Damm D, Allen CM, Bouquot JE (2009). *Oral Maxillofacial Pathology*, 3rd ed. St. Louis: Saunders: 409-13.
51. Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, Asanuma H, Ikeda T, Satoh M, Hiratsuka H, Tokino T, Sawada N (2005). Abnormal β -catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Human Pathol*.36:234-41.
52. Ochoa-Hernandez AB, Juarez-Vazquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Nunez P (2012). WNT-beta-catenin signaling pathway and its relationship with cancer. *Cir Cir*.80(4):389-98.
53. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW (1997). Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*.272(40):24735-8.
54. Pannone, G., Santoro, A., Papagerakis, S., Lo Muzio, L., De Rosa, G. & Bufo, P. (2011). The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer* 6 (4).
55. Pérez Plasencia C, Dueñas González A, Bustos Martínez J (2008). Activación de la vía Wnt/beta catenina en el proceso de carcinogénesis cervical. *Arch Med*. 4(5): 1-10.
56. Psyrris A1, DiMaio D (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. Jan;5(1):24-31
57. Rampias T, Boutati E, Pectasides E, Sasaki C, Kountourakis P, Weinberger P, Psyrris A (2010). Activation of Wnt Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncogenes in HPV16-Positive Oropharyngeal Squamous Carcinoma Cells. *Mol Cancer Res*; 8:433-443.
58. Rautava, J. & Syrjanen, S. (2012). Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*. 6(1):3-15.

59. Reya T, Clevers H (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*.434(7035):843-50.
60. Reyes M , Rojas-Alcayaga G, Pennacchiotti G, Carrillo D, Muñoz JP, Peña N, Montes R, Lobos N, Aguayo F (2015). Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients. *Experimental and Molecular Pathology*. 1:95–99.
61. Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Maturana A, Aitken J-P, Rojas C, Ortega A-V (2015). Increased nuclear β -catenin expression in oral potentially malignant lesions: A marker of epithelial dysplasia. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 20 (5): 540-546.
62. Riera P, Martínez B (2005). Morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in Chile. *Rev Med Chil*.133(5):555-63.
63. Salem, A. (2010). Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. *Ann Oncol* 21, 13-17.
64. Sand, L. & Jalouli, J. (2014). Viruses and oral cancer. Is there a link?. *Microbes Infect* 16, 371-378.
65. Sano D, Myers JN (2007). Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Metastasis Rev*. 26(3-4):645-62.
66. Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY (2002). Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol*. 38:772–8.
67. Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907.
68. Scully C. y Bagan J (2009). Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 15(6):388–399,
69. Sessions D, Spector G, Lenox J, Haughey B, Chao C, Marks J (2002). Analysis of treatment results for oral tongue cancer. *Laryngoscope*.112:616-25.
70. Sessions D, Spector G, Lenox J, Parriot S, Haughey B, Chao C (2000). Analysis of treatment results for floor of mouth cancer. *Laryngoscope*.110:1764-72.

71. Shuyama, K., Castillo, A., Aguayo, F., Sun, Q., Khan, N., Koriyama, C. & Akiba, S. (2007). Human papillomavirus in high- and low-risk areas of esophageal squamous cell carcinoma in China. *Br J Cancer* 96, 1554-1559.
72. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*62(1):10-29.
73. Staal F., Clevers H (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nature Reviews Immunology* 5, 21-30.
74. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Mutational analysis of the APC/b-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58:1130-1134.
75. St Guily, J. L., Jacquard, A. C., Pretet, J. L., Haesebaert, J., Beby-Defaux, A., Clavel, C., Agius, G., Birembaut, P., Okais, C., Leocmach, Y., Soubeyrand, B., Pradat, P., Riethmuller, D., Mouglin, C. & Denis, F. (2011). Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France. The EDiTH VI study. *J Clin Virol* 51, 100-104.
76. Syrjänen, S (2010). Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*, 118: 494–509.
77. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2007). The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci.*104(4):293-302.
78. Thierry, F. (2009). Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 384, 375-379.
79. Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, Shinya T, Tsuhako W, Tamura Y, Kosugi T, Sato N, Ogi K, Hiratsuka H (2006). Aberrant expression of β -catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 35:356–61.
80. Warnakulasuriya KA, MacDonald DG (1995). Epithelial cell kinetics in oral leukoplakia. *J Oral PatholMed.*24(4):165-9.
81. Williams HK, Sanders DS, Jankowski JA, Landini G, Brown AM (1998). Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 27:308-17.

82. World Health Organization, International histological classification of tumors, 2nd ed., Springer: Berlin; 1998. 15-168.
83. Yokota J, Sugimura T (1993). Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7(10):920-5.
84. Yu Z, Weinberger PM, Provost E, Haffty BG, Sasaki C, Joe J (2005). Beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 11:2471-7.
85. ZurHausen, H. (2009) Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J Med Res* 130, 209.

12. ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 23 de agosto de 2011, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"FUNCIÓN DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DE HPV-16 EN CARCINOGENESIS ASOCIADA AL HUMO DEL TABACO: INTERACCIÓN ENTRE COMPONENTES DEL HUMO DEL CIGARRILLO Y LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DE HPV-16 EN CÉLULAS EPITELIALES ORALES Y BRONQUIALES Y ESPECÍMENES CLÍNICOS"** y cuyo investigador responsable es el **Dr. Francisco Aguayo G.**, quien desempeña funciones en el **Programa Disciplinario de Microbiología, ICBM, Universidad de Chile.**

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



2/2

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

26 Ago. 2011

- a) Carácter de la población estudiada:
 - 1) Pacientes con indicación de extracción de 3er molar.
 - 2) Muestras de biopsia pulmonar fijadas en formalina de pacientes con cáncer pulmonar (n=250).
 - 3) Muestras de cáncer oral prospectivas n=40 + 90 muestras retrospectivos (65 de fumador y 65 de no fumador).
- b) Utilidad del Proyecto: Útil para el conocimiento de interacciones entre humo de tabaco y VPH.
- c) Riesgos y Beneficios: - No tiene beneficio directo para los participantes, - Riesgo no mayor que la intervención que por indicación odontológicamente está siendo sometido (biopsia oral, extracción 3er molar).
- d) Protección de los participantes: El Consentimiento Informado asegura la confidencialidad del manejo de la información.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: El proyecto no implica la evaluación de terapias ni procedimientos.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 25 de agosto de 2011, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 26 de agosto de 2011.



Sra. Marianne Gaudlitz H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 071-2011

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

"Función de las oncoproteínas E6 y E7 de virus papiloma humano (HPV) tipo 16 en carcinogénesis asociada a humo del tabaco: Interacción entre componentes del humo del cigarrillo y las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales orales y bronquiales y especímenes clínicos"

FRANCISCO RENAN AGUAYO GONZALEZ
PROGRAMA DE VIROLOGIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS (ICBM)
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

1. INTRODUCCION

Este documento tiene como objetivo entregarle toda la información necesaria para que Ud. decida o no participar en esta investigación. En este estudio, 100 pacientes diagnosticados clínica e histopatológicamente con cáncer pulmonar serán incluidos.

Las infecciones virales pueden estar involucradas en el desarrollo de algunos tipos de cáncer. El objetivo de esta investigación es determinar la eventual presencia, importancia e impacto de infecciones virales en muestras de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar.

HPV cancer pulmonar/FAG

26 AGO. 2011



2. PROCEDIMIENTOS

Ud. ha sido invitado(a) para participar en la presente investigación dado que Ud. ha sido diagnosticado(a) por su médico tratante con cáncer pulmonar.

Si Ud. acepta participar, un trozo pequeño del mismo tejido que ya le ha sido extraído para los fines diagnósticos y clínicos de rutina, será usado para el presente estudio.

Este tejido ha sido fijado en formalina e incluido en parafina y almacenado en dependencias del Laboratorio de Anatomía Patológica, Servicio de Laboratorios, Instituto Nacional del Tórax (José Manuel Infante 717, 2° piso).

Es importante que Ud. sepa que esta investigación no implica alteración en los procedimientos médicos realizados de rutina que su médico tratante le ha indicado. En este estudio no se le tomará una nueva muestra ni se llevará a cabo intervención médica adicional más allá que la estrictamente señalada y que ya ha sido efectuada en el procedimiento clínico establecido.

3. BENEFICIOS

La realización de esta investigación no representa beneficio alguno para usted. De la misma manera, Ud. no recibirá beneficio económico alguno. Sin embargo, otros pacientes con su misma enfermedad se podrían ver beneficiados en el futuro con éste estudio a través del conocimiento generado en el mismo.

4. RIESGOS

La realización de esta investigación biomédica no significa absolutamente ningún riesgo adicional para Ud.

5. COSTOS

La realización de esta investigación no implica ningún gasto adicional para Ud.



26 AGO 2011

6. CONFIDENCIALIDAD

Su información personal y médica será mantenida en forma confidencial y no serán conocidas por el Investigador principal ni por personal de laboratorio implicado en la presente investigación. La muestra de tejido recolectada será entregada al investigador principal de manera anónima.

La información generada solo será utilizada para los fines de la presente investigación. No se llevarán a cabo estudios de tipo genético en la biopsia recolectada.

7. DERECHOS

Ud. es libre de aceptar o no participar en la presente investigación. Si Ud. decide aceptar y luego retirarse de esta investigación, su trozo de tejido no será analizado y la información obtenida por concepto de la presente investigación no será usada.

Ud. puede retirarse de la presente investigación en el momento que desee sin perder los derechos que le asisten como paciente.

Su participación en esta investigación es absolutamente voluntaria y se hará efectiva sólo cuando firme este consentimiento informado.

8. CONTACTOS

Si Ud. desea obtener más información sobre los alcances de esta investigación puede contactarse directamente con el

HPV cancer pulmonar/FAG

4

investigador principal, Francisco Aguayo G., Ph.D. (TEL. 56-2-9786923) correo electrónico: faquayo@med.uchile.cl.



Adicionalmente, si Ud. necesita información sobre sus derechos como sujeto en una investigación biomédica, se puede contactar con el Dr. Manuel Oyarzún, Presidente del Comité de ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, (TEL 56-2-9786923).

Si decide participar, le solicitamos su autorización, firmando este documento. Si Ud. decide no participar, su atención en salud no se verá afectada.

He recibido la información arriba descrita, de manera voluntaria, esclarecida y sin influencia de ningún tipo,

si acepto / no acepto participar en esta investigación.

Nombre paciente:

Firma:..... Fecha:.....

Nombre Investigador principal.....

Firma:..... Fecha:.....

Nombre director Institución o su delegado.....

Firma:..... Fecha:.....

HPV cancer pulmonar/FAG

