

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

---



**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE P53, COX-2 , EGF Y EGFR COMO MARCADORES  
DE RIESGO DE CÁNCER DE LARINGE**

**PAULA ISABEL ESCALANTE ESCALANTE**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FARMACOLOGÍA**

Director de Tesis: Ph.D. Luis A. Quiñones Sepúlveda

Co-director de Tesis: Ph.D. Carla Miranda Melo

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata**

**PAULA ISABEL ESCALANTE ESCALANTE**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Octubre de 2017.**

**Prof. Dr. Luis Quiñones Sepúlveda  
Dra. Carla Miranda Melo  
Directores de Tesis  
Facultad de Medicina Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dra. Gabriela Díaz V.**

**Prof. Dr. Dante Cáceres L.**

**Prof. Dra. Virginia Fernández A.**

**Prof. Dra. Luisa Herrera C.**

**Prof. Dr. Luis Quiñones Sepúlveda  
Presidente Comité Magíster en Farmacología**

*A mi madre, que me enseñó los valores de  
la perseverancia, la honestidad y la integridad,  
y me motivó a alcanzar mis sueños*

*A mi gato Tigrito  
aún cuando ya no esté con nosotros  
su inocencia y amor incondicional  
siempre estarán en mi corazón*

*“Cuando un hombre ama a los gatos, soy su amigo  
y camarada sin más presentaciones”.  
Mark Twain.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco especialmente al Dr. Luis Quiñones Sepúlveda, por haber depositado su confianza en mí, y por darme la oportunidad de participar en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética. Gracias por permitirme volver a sentir la emoción de dedicarme a la ciencia.

A los miembros de mi comisión revisora integrados por la Dra. Virginia Fernández, la Dra. Luisa Herrera, que, gracias por sus minuciosas correcciones, han hecho de esta tesis un trabajo del que me siento muy orgullosa, al Dr. Dante Cáceres por ayudarme en los complejos caminos de la estadística, y a la Dra. Gabriela Díaz, quien me ha motivado y apoyado afectuosamente desde el inicio de mi camino en este programa de Magister.

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética, al Dr. Nelson Varela, Dra. Carla Miranda Melo, Juan Pablo Cayún, María Alejandra Lavanderos, Leslie Cerpa, Christopher Sandoval, Roberto Cerro, Matías Martínez, Stephanía Contreras y a todos los demás miembros que me han acompañado, enseñado y apoyado cuando he necesitado un consejo, y me han tendido una mano cuando he estado corta de tiempo. Este trabajo no estaría terminado sin su apoyo.

Agradezco a mis amigos y pareja por esos necesarios momentos de distracción, y por el apoyo y cariño que me han dado. A mi familia por su amor incondicional, a mi tía Ximena, a mi abuelo Custodio, y a mi tía Dina por insistirme en volver a estudiar. A mi madre María Teresa por ser la persona más importante e influyente en mi vida. Gracias por creer siempre en mí, por enseñarme los valores que me hacen ser quien soy y por estar a mi lado en todo este proceso.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
Epidemiología	14
Fisiología de la Laringe	15
Fisiopatología del Cáncer de Laringe y de Carcinomas de Cabeza y Cuello	17
Etiología	21
Diagnóstico	23
Tratamiento	24
Biomarcadores Genéticos en Cáncer de Laringe	25
Ciclooxigenasa 2	26
Vía de Señalización de Factor de Crecimiento Epidérmico	28
Supresor de Tumores P53	30
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
Objetivo General	34
Objetivos Específicos	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1.    Diseño de Estudio	35
2.    Pacientes en estudio:	35
3.    Tamaño Muestral	35
4.    Consentimiento informado	36
5.    Criterios de inclusión	36
6.    Criterios de exclusión	36

7.	Aspectos éticos	36
8.	Análisis de genotipo para variantes genéticas de COX-2, EGF, EGFR y P53	37
9.	Análisis de datos	38
RESULTADOS		39
1.	Características de la población de estudio	39
1.1.	Etapificación del cáncer y tratamiento en pacientes con cáncer de laringe	39
2.	Genotipificación de polimorfismos analizados	40
3.	Frecuencia genotípicas y alélicas para las variantes analizadas	40
4.	Comparación de frecuencias alélicas con otros grupos étnicos	41
5.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	41
6.	Análisis bivariado de asociación entre factores ambientales y riesgo de cáncer de laringe	42
7.	Análisis bivariado de asociación entre SNPs y riesgo de cáncer de laringe	42
8.	Análisis multivariado de riesgo	44
9.	Análisis de interacción entre variantes genéticas y consumo de tabaco	46
10.	Análisis de interacción entre variantes genéticas y el consumo combinado de cigarro y alcohol	49
11.	Análisis de asociación entre variantes genéticas y sobrevida global	52
12.	Análisis de desequilibrio de ligamiento para polimorfismos del gen COX-2	53
13.	Cálculo corregido de tamaño de muestra	53
DISCUSIÓN		55
Factores genético-ambientales y riesgo de cáncer de laringe		55
Análisis de sobrevida global <i>versus</i> SNP		57
Biología molecular del cáncer de laringe y mecanismos de carcinogénesis		59
Limitaciones del trabajo de investigación		64
CONCLUSIONES		66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		67

ANEXOS	73
Anexo 1: Resumen de proyecto de Investigación	73
Anexo 2: Consentimiento Informado	74
Anexo 3: Ficha clínica para pacientes con cáncer de laringe	76
Anexo 4: Ficha clínica para voluntarios sin diagnóstico de cáncer	77
Anexo 5: Resolución Exenta N° 4352, aprueba el proyecto de investigación	78
Anexo 6: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)	81
Anexo 7: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)	83
Anexo 8: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)	85
Anexo 9: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)	87
Anexo 10: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)	89
Anexo 11: Etapificación del cáncer y tratamiento en pacientes con cáncer de laringe	91
Anexo 12: Cantidad de muestras genotipificadas para cada variante según grupo de estudio.	91
Anexo 13: Equilibrio de Hardy-Weinberg	92
Anexo 14: Prueba de equilibrio de ligamiento para COX-2 rs20417 y COX-2 rs689466	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Incidencia y mortalidad de carcinoma escamoso de laringe en Chile	14
Tabla 2: Guía para clasificación de cáncer de laringe según sistema TMN	19
Tabla 3: Guía para la etapificación de cáncer de laringe según clasificación TMN	20
Tabla 4: Riesgo relativo de desarrollo de CL según la condición de fumador en la población chilena	22
Tabla 5: Frecuencia de genotipos rs20417 y rs689466 de COX-2, rs4444903 de EGF, rs2227983 de EGFR y rs1042522 de P53 observados en distintos grupos étnicos.	33
Tabla 6: Características generales de la población de estudio	39
Tabla 7: Frecuencia genotípica y alélica para variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522	40
Tabla 8: Frecuencia de genotipos COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 observada en el grupo de control y comparada con frecuencias observadas en otras poblaciones	41
Tabla 9: Análisis bivariado de riesgo de cáncer de laringe según factores ambientales	42
Tabla 10: Análisis bivariado de riesgo según distintos modelos de penetrancia para COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 observados en las distintas poblaciones estudiadas	43
Tabla 11: Análisis multivariado de riesgo según variantes genéticas y factores ambientales	43
Tabla 12: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y COX-2 rs20417	47
Tabla 13: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y COX-2 rs689466	47
Tabla 14: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y EGF rs4444903	47
Tabla 15: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y EGFR rs2227983	48
Tabla 16: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y P53 rs1042522	48
Tabla 17: Interacción Cigarro y Alcohol	49
Tabla 18: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y COX-2 rs20417	50

Tabla 19: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y COX-2 rs689466	50
Tabla 20: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y EGF rs4444903	51
Tabla 21: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y EGFR rs2227983	51
Tabla 22: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y P53 rs1042522	52
Tabla 23: Análisis de sobrevida global según genotipo en grupo de pacientes CL	53
Tabla 24: Fórmula de PCR para amplificación de COX-2 rs20417	81
Tabla 25: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417	81
Tabla 26: Fórmula para digestión del producto de PCR de COX-2 rs20417	82
Tabla 27: Fórmula de PCR para amplificación de COX-2 rs689466	83
Tabla 28: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de rs689466 del gen COX-2	83
Tabla 29: Fórmula para digestión del producto de PCR de COX-2 rs689466	84
Tabla 30: Fórmula de PCR para amplificación de EGF rs4444903	85
Tabla 31: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de EGF rs4444903	85
Tabla 32: Fórmula para digestión del producto de PCR de EGF rs4444903	86
Tabla 33: Fórmula de PCR para amplificación de EGFR rs2227983	87
Tabla 34: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983	87
Tabla 35: Fórmula para digestión del producto de PCR de EGFR rs2227983	88
Tabla 36: Fórmula de PCR para amplificación de P53 rs1042522	89
Tabla 37: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de P53 rs1042522	89
Tabla 38: Fórmula para digestión del producto de PCR de P53 rs1042522	90
Tabla 39: Características de estadio patológico y tratamiento en pacientes CL	91
Tabla 40: Cantidad y porcentaje de muestras exitosamente genotipificadas para cada variante	91

Tabla 41: Determinación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas de COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 determinadas en el grupo de controles 92

---

Tabla 42: Prueba de equilibrio de ligamiento para COX-2 rs20417 y COX-2 rs689466 93

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura de la laringe y sus regiones estructurales	16
<b>Figura 2:</b> Estructura del tejido epitelial de las cuerdas vocales	17
<b>Figura 3:</b> Imágenes histológicas de carcinoma escamoso bien diferenciado y pobremente diferenciado	18
<b>Figura 4:</b> Aumento del riesgo relativo de cáncer de laringe a consecuencia de la combinación del consumo de tabaco y alcohol	22
<b>Figura 5:</b> Esquema básico de la vía de señalización inflamatoria mediada por COX-2/Prostaglandinas	27
<b>Figura 6:</b> Esquema básico de las cascadas de señalización mitogénicas mediadas por EGF/EGFR	29
<b>Figura 7:</b> Estructura lineal y tridimensional de P53	31
<b>Figura 8:</b> Esquema de las interacciones observadas entre COX-2, EGF, EGFR y P53	32
<b>Figura 9:</b> Esquema corregido de las interacciones observadas entre COX-2, EGF, EGFR y P53	63
<b>Figura 10:</b> Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417	82
<b>Figura 11:</b> Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs689466	84
<b>Figura 12:</b> Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de EGF rs4444903	86
<b>Figura 13:</b> Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983	88
<b>Figura 14:</b> Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de P53 rs1042522	90

## RESUMEN

El carcinoma escamoso de laringe es una enfermedad altamente invalidante ya que puede afectar la capacidad del habla, respiración y deglución del paciente que lo sufre. Los principales factores causales identificados son cigarro y alcohol. Las vías de respuesta inflamatoria, proliferativa y de reparación de ADN pueden contribuir al riesgo de cáncer de laringe. El objetivo de este estudio es determinar asociaciones entre variantes genéticas COX-2 rs20417, COX-2 rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 y el riesgo de cáncer de laringe en la población chilena. Se realizó un estudio casos y controles, con 100 pacientes con cáncer escamoso de laringe y 139 voluntarios adultos sin cáncer. La genotipificación se realizó mediante PCR-RLFP. Se observa que estos polimorfismos son capaces de incrementar el riesgo de cáncer de laringe asociado a la combinación de consumo de tabaco y alcohol en una razón de 0,34 veces para COX-2 rs20417, 0,5 veces para EGF rs4444903, 0,56 veces para P53 rs1042522, 1,72 veces para EGFR rs2227983 y 4,7 veces para COX-2 rs689466. Esto sugiere que las variantes COX-2 rs20417, COX-2 rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 actúan como modificadores de riesgo de cáncer de laringe.

## **ABSTRACT**

Laryngeal squamous cell carcinoma is a kind of cancer that can be highly disabling to the patient, affecting speech, swallowing and respiratory skills, and leading to impaired quality of life. Smoking and alcohol abuse are principal risk factors linked to this disease. Inflammation signaling pathways, mitogens and DNA repair genes are factors that can be involved in carcinogenesis. The aim of this research is to assess the effect of COX-2 rs20417, COX-2 rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 single nucleotide polymorphisms in the risk of laryngeal cancer development in Chilean population. For this case control study, we recruited 100 cancer patients and 139 healthy volunteers. SNP genotype was analyzed from genomic DNA by PCR-RFLP. We observed that these SNPs are capable of increase the smoking plus alcohol risk of laryngeal cancer in a ratio of 0,34 fold for COX-2 rs20417 SNP, 0,5 fold for EGF rs4444903 SNP, 0,56 fold for P53 rs1042522 SNP, 1,72 fold for EGFR rs2227983 SNP and 4,7 fold for COX-2 rs689466 SNP. These findings suggest that COX-2 rs20417, COX-2 rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 and P53 rs1042522 single nucleotide polymorphisms acts as risk modifier factors for laryngeal cancer.

# INTRODUCCIÓN

## EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de laringe (CL) es un tipo de neoplasia maligna que se origina en los tejidos que conforman la laringe. La mayoría de los casos de CL se da en personas mayores de 65 años y es de 3 hasta 10 veces más frecuente en hombres que en mujeres [2,11]. La forma más común de CL es el carcinoma escamoso de laringe, y forma parte de un grupo mayor denominado carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECyC), junto con otros tipos de cáncer como el carcinoma escamoso de labio y cavidad oral, carcinoma escamoso nasofaríngeo y carcinoma escamoso de faringe [11].

La incidencia y mortalidad ajustada por sexo y edad para este tipo de cáncer en Chile es se detallan en la tabla N° 1 [20]. El 2017 se estima que sólo en Estados Unidos se diagnosticarán 13.360 nuevos casos de CL (10.570 hombres, 2.790 mujeres) y 3.660 personas morirán por esta causa (2.940 hombres y 720 mujeres) [2].

**Tabla 1: Incidencia y mortalidad de carcinoma escamoso de laringe en Chile**

	Hombres	Mujeres	Total
Incidencia	1,8	0,2	1,2
Mortalidad	1,4	0,2	0,8

Incidencia y mortalidad de carcinoma escamoso de laringe por cada 100.000 habitantes en Chile. Fuente: Globocan 2012 [20].

La tasa de supervivencia global del CL a 5 años es de un 60% a 70%, cifra mayor a la estimada para CECyC que corresponde a un 50%. La tasa de supervivencia es mayor en mujeres respecto a hombres, pero debido a cambios en las conductas de consumo de tabaco y alcohol se observa una tendencia a la disminución de la razón hombres:mujeres tanto en la incidencia como la mortalidad, que parece tener origen en el aumento del consumo de tabaco en la población femenina en los últimos 20 años [6].

Europa oriental, Sudamérica y Asia occidental son las regiones con mayor riesgo de cáncer de laringe a nivel global, mientras que en países más desarrollados como Norteamérica, Gran Bretaña y otros países de Europa occidental se observa un descenso progresivo en la incidencia de CL y CECyC en los últimos años, gracias a la disminución de la exposición a tabaco y otros carcinógenos. En base a esta tendencia se proyecta un

descenso en la incidencia de CL de un 17% en el Reino Unido para el año 2035 comparado al año 2014 (*Cancer Research UK, 2015*) [6,11].

Chile y otros países en vías de desarrollo presentan una diferencia de 40 años en el patrón epidemiológico del consumo de tabaco en comparación con países desarrollados, y se espera que las consecuencias de esta brecha temporal tengan un importante impacto en la mortalidad por CECyC para el año 2030, con una cifra global estimada de 600.000 muertes por año para esa fecha, doblando la cifra estimada de muertes por esta causa en el año 2013 [10].

## **FISIOLOGÍA DE LA LARINGE**

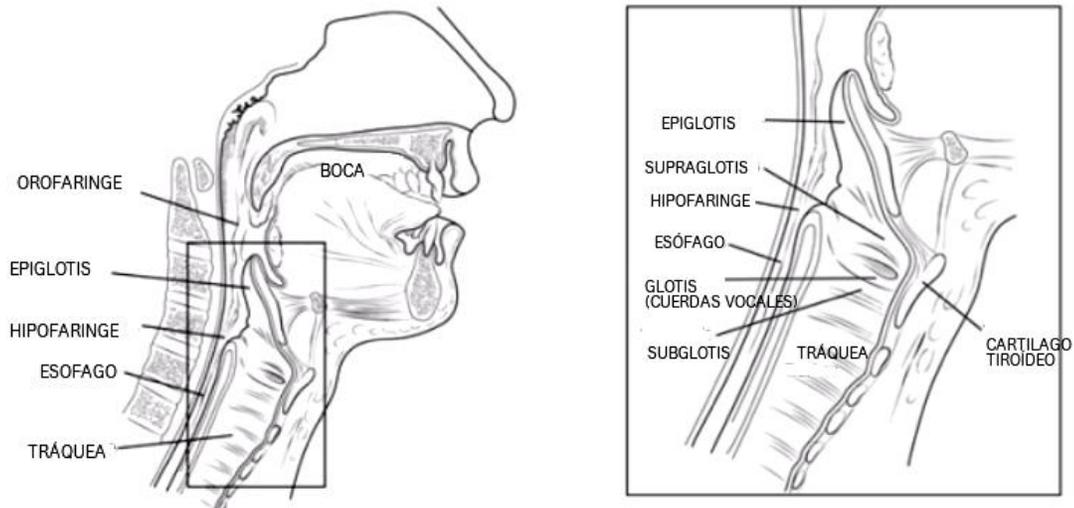
La laringe es el órgano que comunica la faringe con la tráquea. Está formada por una compleja red de cartílagos y músculos que cumplen principalmente con 3 funciones: cerrar la unión entre la faringe y la tráquea al deglutir, evitando que los alimentos y líquidos ingeridos se desvíen de su paso al esófago y lleguen al sistema respiratorio inferior; contiene las cuerdas vocales que permiten realizar la función adaptativa de fonación; y por último al respirar las cuerdas vocales se abren naturalmente permitiendo el paso de aire a los pulmones [31,41].

La función del habla se lleva a cabo en este órgano por medio de la fina contracción de los músculos de la laringe y la vibración controlada de las cuerdas vocales. Un paciente puede sobrevivir a la extirpación quirúrgica de la laringe, pero sin ésta la capacidad del habla se pierde por completo [2,4,31].

Como se ilustra en la figura 1, la laringe se divide estructuralmente en tres regiones: la supraglotis, que entre otras estructuras contiene la epiglotis, estructura cartilaginosa responsable de evitar el paso del bolo alimenticio al sistema respiratorio; la glotis donde se encuentran las cuerdas vocales responsables de la capacidad de fonación, y la subglotis que se extiende 10 mm por debajo del borde inferior de la cuerda vocal y termina en el borde inferior del cartílago cricoides, donde conecta con la tráquea.

Debido a la forma en que se desarrolla la laringe durante el crecimiento embrionario, ésta se encuentra compartimentada entre la supraglotis y glotis, estructuras que no comparten circulación linfática haciendo muy poco probable la diseminación tumoral de una región anatómica a la otra. Estas diferencias estructurales son importantes ya que la clasificación

del estadio de cáncer, esquema de tratamiento y pronóstico de la enfermedad difieren según la localización de origen del cáncer, y suele ser menos favorable cuando tiene origen en la supraglotis [6,11,31].



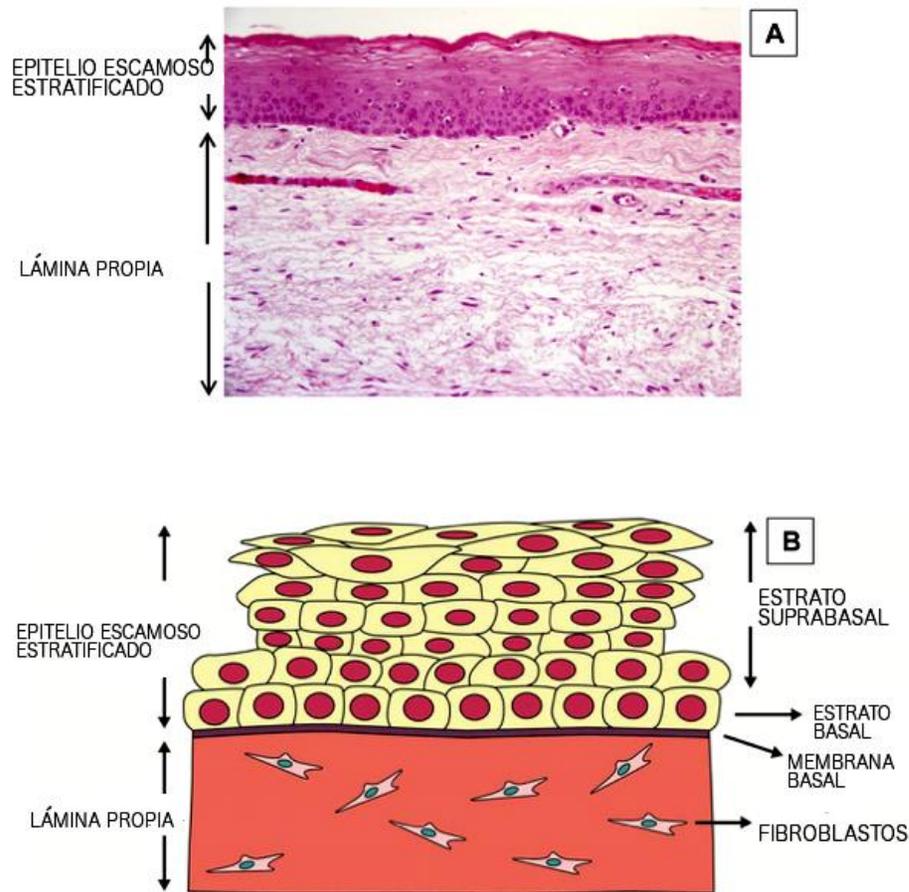
**Figura 1:** Estructura de la laringe y división en tres regiones estructurales: supraglotis, glotis y subglotis. Fuente: *American Cancer Society*. 2017 [2].

El lumen de la laringe está cubierto por dos tipos de epitelio, el epitelio columnar pseudo-estratificado ciliado cubre las porciones de la supraglotis y la subglotis, el cual cambia paulatinamente a epitelio escamoso estratificado en la porción de cuerdas vocales y la región superior más superficial de la epiglottis. Ambas capas se encuentran fuertemente unidas en su base a una capa de tejido conectivo de soporte llamada lámina propia.

El epitelio escamoso estratificado es característico de tejidos que se ven expuestos a gran cantidad de irritantes externos y fuerzas mecánicas que ejercen constante agresión sobre el mismo, mientras que el epitelio columnar pseudo-estratificado ciliado facilita el flujo de moco que mantiene hidratado el epitelio y expulsa partículas externas que puedan quedar atrapadas en él (barrido mucociliar).

Las células en ambos epitelios poseen múltiples uniones intercelulares, complejos proteicos especializados en funciones de oclusión (occludinas), anclaje (desmosomas, E-cadherina,  $\beta$ -catenina) y de comunicación intercelular (uniones Gap) que permiten la rápida distribución de cascadas de señalización entre células adyacentes. Además, en la superficie de este epitelio se expresan múltiples canales y bombas de transporte de iones (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y se encuentran células caliciformes productoras de moco que

ayudan a mantener la humedad y otorgar protección tejido epitelial, cuya principal función es servir de barrera a agentes nocivos del exterior [24].

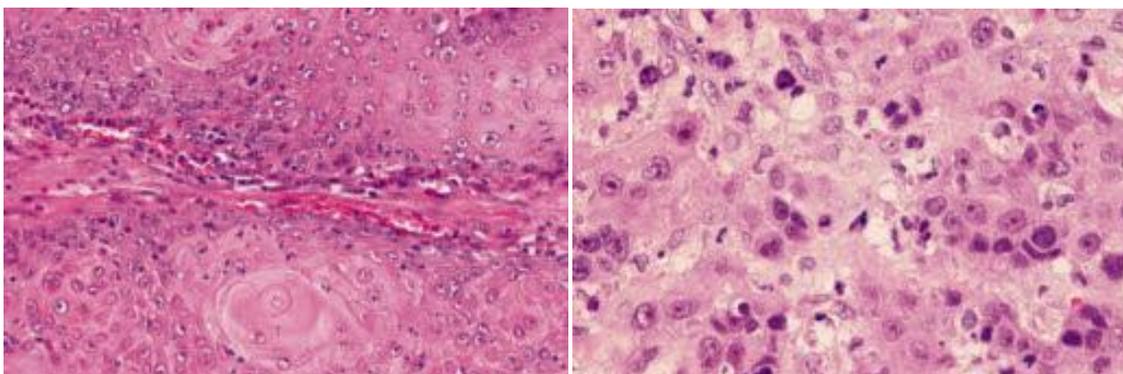


**Figura 2:** Estructura del tejido epitelial de las cuerdas vocales. Este se clasifica en un epitelio escamoso estratificado formado por múltiples capas de células escamosas estrechamente agrupadas. En la parte superior se observa un corte histológico de epitelio humano, y en la parte inferior una figura esquemática de la barrera epitelial. Las células del tejido epitelial están divididas en dos secciones, el estrato supra-basal en su porción más cercana al lumen de la laringe, y estrato basal más próximo a la lámina propia, y anclado a ésta por medio de la membrana basal. JSLHR, 2015 [24].

## FISIOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE LARINGE Y DE CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO

Más del 90% de las neoplasias malignas de cabeza y cuello se diagnostican histológicamente como carcinoma de células escamosas [2,6,11,31]. Estas son células aplanadas y delgadas que conforman el epitelio que cubre el lumen de las estructuras de la cavidad oral y del sistema respiratorio superior. Según el grado de diferenciación del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello se encuentran neoplasias en tipo bien

diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado (*figura 2*). El carcinoma escamoso de laringe también puede sub-clasificarse según su histología en carcinoma verrucoso, carcinoma escamoso basaloide, carcinoma escamoso papilar, pseudo-sarcoma, carcinoma escamoso acantolítico, entre otros. En raras ocasiones el CL tiene origen en las glándulas salivares menores que se encuentran distribuidas en el epitelio escamoso de la laringe, las cuales tienen la función de producir mucus y saliva para mantener hidratado el epitelio local. En estos casos puntuales estaríamos tratando con un adenocarcinoma, un carcinoma adenoide quístico, o un carcinoma mucoepidermoide, y en casos aún menos frecuentes puede producirse un condrosarcoma o melanoma de laringe [2,6,31].



**Figura 3:** Imágenes histológicas de carcinoma escamoso bien diferenciado (izquierda) y pobremente diferenciado (derecha). La histología del carcinoma escamoso bien diferenciado tiene una alta similitud con la que se observa en el tejido epitelial sano, mientras que en el carcinoma escamoso pobremente diferenciado se observa una gran cantidad de células inmaduras, mitosis atípicas y menor queratinización comparado con el tejido epitelial normal. Fuente: IARC, 2005 [6].

El cáncer de laringe se puede clasificar según su sitio de origen en tipo glótico o supra-glótico. Los tumores glóticos son con frecuencia detectados en etapas más precoces, ya que el paciente suele percibir un cambio en la voz que facilita la consulta médica oportuna. Además, debido a barreras anatómicas que confinan al tumor al interior de la región glótica y la poca presencia de circulación linfática en este tejido, estos tumores tienen una baja tasa de diseminación tumoral y pueden pasar un largo tiempo sin invadir los nódulos linfáticos cervicales y paratraqueales, y sin hacer metástasis. Los tumores supra-glóticos en cambio, suelen tener un peor pronóstico debido a que las estructuras anatómicas de la región supra-glótica poseen una abundante red de vasos sanguíneos y linfáticos, por lo que es frecuente que el carcinoma supra-glótico invada tejidos extralaringeos como la base de la lengua, región post-cricoídea y senos piriformes, o se disemine a los ganglios linfáticos cervicales.

En el CL la metástasis a distancia es infrecuente al momento del diagnóstico, y suele observarse en estados avanzados de la enfermedad o en caso de recidiva, invadiendo con más frecuencia los pulmones, huesos o hígado [11,31].

Dependiendo del grado de invasión y diseminación del tumor al momento del diagnóstico este se clasifica según el sistema TNM establecido por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), clasificación que difiere dependiendo de si se trata de un carcinoma supra-glótico o glótico. En la Tablas N° 3 y 4 se presentan los criterios aplicados actualmente en Chile para la etapificación de CL.

La clasificación TMN es un sistema de etapificación de cáncer que considera el tamaño y extensión del tumor principal (clasificación T), el grado de compromiso de ganglios linfáticos próximos al tumor (clasificación N), y la presencia de metástasis a otras regiones del cuerpo (clasificación M) como criterios para definir distintas etapas de progresión de cáncer al momento del diagnóstico, y es un dato fundamental para la toma de decisiones respecto al tratamiento y la estimación del pronóstico para el paciente.

**Tabla 2: Guía para clasificación de cáncer de laringe según sistema TNM**

**Clasificación T: Tumor primario**

	<b>Carcinoma glótico</b>	<b>Carcinoma supra-glótico</b>
<b>T<sub>x</sub></b>	Tumor primario no puede ser evaluado	
<b>T<sub>0</sub></b>	Sin evidencia de tumor primario	
<b>T<sub>is</sub></b>	Carcinoma in situ. No sobrepasa la membrana basal del epitelio	
<b>T<sub>1</sub></b>	Tumor limitado a cuerda vocal, con o sin compromiso de comisura anterior/posterior. Movilidad cordal normal.	Tumor limitado a un sub-sitio anatómico.
<b>T<sub>2</sub></b>	Tumor se extiende a supraglotis o subglotis, con limitación de la movilidad cordal.	Tumor involucra más de un sub-sitio anatómico, o bien se extiende a glotis. Cuerdas vocales móviles.
<b>T<sub>3</sub></b>	Tumor confinado a la laringe, con fijación cordal.	Tumor confinado a laringe con fijación cordal, o con extensión a región post-cricoidéa, seno piriforme medial o espacio pre-epiglótico.
<b>T<sub>4</sub></b>	Tumor infiltra cartílago tiroides y/o presenta extensión extra-laríngea.	

**Tabla 2: Guía para clasificación de cáncer de laringe según sistema TNM (Continuación)**

<b>Clasificación N: Ganglios linfáticos regionales</b>	
<b>N<sub>x</sub></b>	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
<b>N<sub>0</sub></b>	No hay metástasis linfáticas regionales.
<b>N<sub>1</sub></b>	Metástasis a un (1) ganglio cervical ipsilateral, de diámetro máximo igual o inferior a 3 cm.
<b>N<sub>2a</sub></b>	Metástasis a un único ganglio ipsilateral, de diámetro mayor entre 3 y 6 cm.
<b>N<sub>2b</sub></b>	Metástasis a múltiples ganglios ipsilaterales, de diámetro no mayor a 6 cm.
<b>N<sub>2c</sub></b>	Metástasis a ganglios bilaterales o contralaterales, ninguno mayor a 6 cm. de diámetro.
<b>N<sub>3</sub></b>	Metástasis a cualquier ganglio cervical de diámetro mayor superior a 6 cm.
<b>Clasificación M: Metástasis a distancia</b>	
<b>M<sub>x</sub></b>	Metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
<b>M<sub>0</sub></b>	No hay metástasis a distancia.
<b>M<sub>1</sub></b>	Metástasis a distancia demostrada.

Guía para clasificación de cáncer de laringe según sistema TNM. Este sistema considera extensión tumoral (T)diseminación a ganglios linfáticos adyacentes (N) y metástasis a distancia (M). Fuente: Revista Médica Clínica las Condes. 2003 [31]

**Tabla 3: Guía para la etapificación de cáncer de laringe según clasificación TNM**

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Estadio 0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio II	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio III	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub> N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio IVa	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4a</sub>	N <sub>2</sub> N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio IVb	T <sub>4b</sub> Cualquier T	Cualquier N N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
Estadio IVc	Cualquier T	Cualquier N	M <sub>1</sub>
Multicéntrico	Presencia de tumores primarios que se desarrollan en dos o más focos independientes en el órgano. Pueden ser sincrónicos (diagnosticados al mismo tiempo), o metacrónicos (se detectan con una diferencia de tiempo de 6 meses o más)		

Guía para la etapificación de cáncer de laringe según clasificación TNM. Fuente: Revista Médica Clínica las Condes. 2003 [6,31]

## ETIOLOGÍA

Existen diversos factores de riesgo comunes para el desarrollo de CECyC y el CL, y los más reconocidos son el consumo de tabaco y alcohol. Una persona que consume grandes cantidades de tabaco puede presentar un riesgo entre 5 a 25 veces mayor de sufrir CECyC comparado con una persona no fumadora.

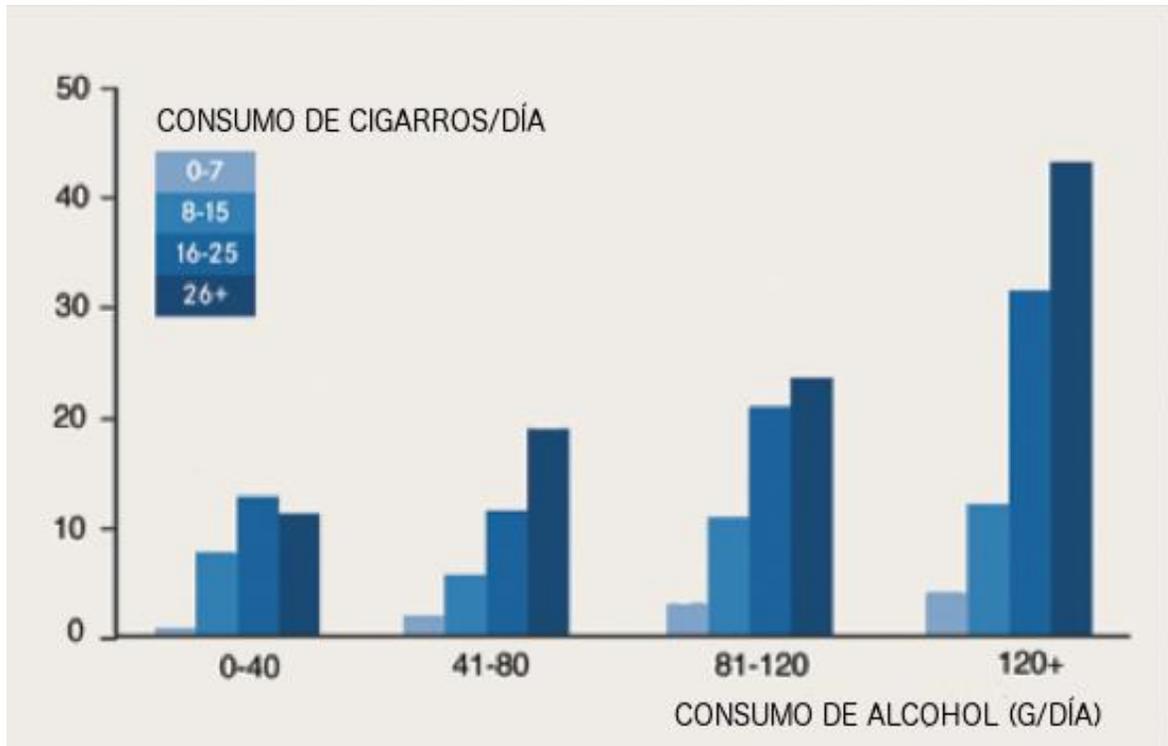
El consumo de alcohol tiene un menor impacto en este sentido, con un aumento del riesgo relativo de CECyC de 2,74 y de 1,54 para CL. Sin embargo, al combinar ambos factores el efecto parece ser sinérgico, por lo que el consumo de ambas sustancias en forma creciente tiene un efecto exponencial en el riesgo relativo de CECyC, lo cual se ilustra en la figura 3 [6,31].

Cerca de 70 sustancias en el humo de tabaco están directamente identificadas como carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos, n-nitrosaminas, aldehídos y aminas aromáticas son algunos ejemplos de compuestos altamente reactivos que por lo general se activan al ser metabolizadas por enzimas de metabolización de xenobióticos, y posteriormente pueden formar aductos en el ADN, quiebres o transversiones nucleotídicas, formar enlaces covalentes con proteínas e inducir lipoperoxidación de membranas.

Aunque el alcohol sólo tiene una sustancia carcinogénica identificada, el acetaldehído producido en la metabolización del alcohol por la enzima aldehído deshidrogenasa, los efectos de esta sustancia son similares a los de la mayoría de los carcinógenos del cigarro.

Se suma a esto el hecho de que el alcohol puede facilitar la permeabilidad de carcinógenos en las membranas de la mucosa y que estos compiten por los sitios activos de enzimas de degradación saturando los mecanismos de eliminación de estas sustancias.

El efecto de la repetida exposición al humo de tabaco y bebidas alcohólicas produce la acumulación de daño que pueden llevar a la inactivación de supresores de tumores o la activación de oncogenes [17,44].



**Figura 4:** Aumento del riesgo relativo de cáncer de laringe a consecuencia de la combinación del consumo de tabaco y alcohol. La intensidad del color representa la cantidad de cigarros al día, el eje horizontal representa el consumo de alcohol diario y el eje vertical representa el riesgo relativo de cáncer de laringe. Fuente: IARC, 2005 [6].

Mutaciones somáticas en el gen supresor de tumores P53 suelen ser frecuentes en pacientes con hábitos de consumo de tabaco y alcohol [2,11]. El MINSAL reconoce el hábito tabáquico como un importante factor de riesgo en el desarrollo de CL y monitoriza el incremento del riesgo y nuevos casos dentro de la población fumadora (tabla N° 4) [39].

**Tabla 4: Riesgo relativo de desarrollo de CL según la condición de fumador en la población chilena**

	RR en Hombres	RR en Mujeres
Fumador	14,6	13,02
Ex- fumador	6,34	5,16

Riesgo relativo de desarrollo de CL según la condición de fumador en la población chilena. Fuente: MINSAL, 2014 [39].

Otros factores de riesgo para CECyC y también para CL son la infección por virus papiloma humano serotipos 16 y 18, malnutrición y déficit de vitamina A, exposición ocupacional a tóxicos como cromo, níquel, radio, gas mostaza, solventes de pinturas,

productos intermedios del proceso de producción de madera o cuero, asbestos, mala higiene dental y reflujo gastroesofágico, con un impacto mínimo por sí solos y por lo general más relacionados a la combinación con el consumo de tabaco y alcohol como factores de riesgo adicionales [2,6,11,31].

Blancos farmacogenéticos también se están estableciendo como biomarcadores de riesgo de desarrollo de CECyC. Se ha determinado la asociación entre la variante polimórfica del gen *GSTM1 null*, que codifica para glutatión S-transferasa, con un riesgo 1,23 veces mayor de desarrollar CECyC. Variantes polimórficas en enzimas de la familia citocromo P450 CYP1A1, CYP1A1\*2C, CYP15 también se han estudiado pero la evidencia es más débil para apoyar el impacto de estos polimorfismos y sólo adquieren relevancia al asociarse a la presencia de la variante *GSTM null* [11,27,28,29,45].

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de cáncer de laringe por lo general se asocia a la presencia de síntomas que se tornan persistentes como cambios en la voz (voz ronca), tos, dolor de garganta, dificultades al tragar, dolor de oído, dificultades respiratorias y pérdida de peso. Estos síntomas son muy poco específicos y suelen confundirse con síntomas propios de enfermedades infecciosas del tracto respiratorio superior. Sin embargo, la exploración preventiva en la población general no ha demostrado ser costo efectiva; la complejidad e incomodidad que produce el examen físico de la laringe (laringoscopia), el cual debe ser realizado por un especialista otorrinolaringólogo, hace que la posibilidad de realizar un *screening* de rutina en personas asintomáticas para este tipo de cáncer sea poco aplicable en la práctica clínica [2,31].

El diagnóstico histológico presenta ciertos desafíos para evitar la confusión con otros tipos de condiciones que pueden afectar el epitelio de la laringe. La hiperplasia pseudoepiteliomatosa es una condición benigna en la que se observa un aumento de la proliferación del tejido epitelial como consecuencia de trauma, infecciones, inflamación o presencia de tumores de células granulares, y que puede ser fácilmente confundida con un carcinoma de células escamosas bien diferenciado. Los carcinomas escamosos pobremente diferenciados se deben diferenciar de otro tipo de tumores malignos como adenocarcinoma, carcinoma neuroendocrino, melanoma y linfoma. Adicionalmente, durante el tratamiento, es necesario diferenciar el carcinoma escamoso con cambios celulares causados por la radioterapia para monitorear correctamente la respuesta al

tratamiento. El uso correcto de inmunohistoquímica es la mejor herramienta para el diagnóstico diferencial [31].

## TRATAMIENTO

Los principales objetivos del tratamiento de CL son otorgar al paciente una cura de la enfermedad, y en segundo lugar preservar o reconstruir estructuras funcionales de la laringe como las cuerdas vocales y la epiglotis. La elección del tratamiento debe considerar múltiples factores como el clasificación TNM al momento del diagnóstico, la localización del tumor, las características del paciente, los tratamientos disponibles y los posibles efectos adversos del tratamiento.

- **Radioterapia:** se indica como principal tratamiento no quirúrgico para pacientes con CL en etapas iniciales ( $T_1$  y  $T_2$ ), ya que permite preservar la función fonatoria hasta en un 95%, y también se utiliza como tratamiento adyuvante en pacientes que han pasado por resección quirúrgica del cáncer en estadio avanzado ( $T_4$ ), con presencia de bordes quirúrgicos positivos o invasión extra-capsular ganglionar, con el propósito de mejorar la probabilidad de éxito de la cirugía. Este esquema de tratamiento conlleva riesgos como la osteorradionecrosis, riesgo de generar un segundo tumor primario radio-inducido y fracaso del tratamiento [31].
- **Cirugía:** el tratamiento quirúrgico del cáncer de laringe parte desde lo menos invasivo con técnicas como la cirugía endoscópica ambulatoria, microcirugía o cirugía laser con  $CO_2$ , llegando a cirugías más radicales como la laringectomía horizontal supra-glótica en carcinomas supra-glóticos en fases  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ , o la laringectomía total indicada en pacientes con CL aún más avanzado. El objetivo de la cirugía es resecar el cáncer en su totalidad mientras se conserva el máximo de la estructura de laringe, pero dependiendo del avance de la enfermedad el paciente puede perder totalmente la capacidad del habla y/o necesitar el uso de un traqueostoma a permanencia. La resección de los ganglios linfáticos cervicales sólo se indica cuando hay un riesgo de diseminación ganglionar oculta superior al 15 – 20%, es decir en cáncer en estadio III o superior [31].
- **Quimioterapia:** la quimioterapia no está recomendada como monoterapia para el tratamiento de CL, y sólo se indica como adyuvante en tratamientos mixtos con radioterapia, cirugía o terapia multimodal, o como tratamiento paliativo en el cáncer terminal metastásico. Los fármacos quimioterápicos más utilizados son cisplatino,

carboplatino, 5-fluorouracilo, paclitaxel y bleomicina, y pueden emplearse solos o en combinación [2].

- **Anticuerpos monoclonales:** las terapias dirigidas como anticuerpos monoclonales contra el receptor de crecimiento epidérmico (Cetuximab) están siendo recientemente incorporadas al esquema terapéutico de CECyC y CL. El uso de Cetuximab en combinación con radioterapia demostró una mejora en la sobrevida de pacientes con CECyC a los 5 años, pero el beneficio neto y la seguridad de estos tratamientos aún son motivo de discusión [42]. Se ha observado en pequeños estudios farmacogenéticos que algunas variantes genéticas tienen influencia en la respuesta al tratamiento y el perfil de efectos adversos en pacientes tratados con este anticuerpo, pero aún es necesario probar si la asociación se mantiene en estudios a mayor escala [15].

Los tumores glóticos y supra-glóticos que son diagnosticados cuando la masa tumoral es pequeña pueden ser tratados de forma conservadora, ya sea con radioterapia o con cirugía poco invasiva con un alto potencial curativo, y si estos pacientes sufren falla de radioterapia pueden ser rescatados mediante cirugía con un alto grado de conservación de la laringe. En caso de recidiva del tumor o fracaso del tratamiento, la laringectomía total está indicada sin afectar la sobrevida del paciente.

El tratamiento requiere además del apoyo de fonoaudiología necesaria para la reeducación fonatoria y en deglución, y de servicios de rehabilitación sicosocial, laboral, vocacional y emocional cuando el paciente tiene una pérdida funcional mayor. La clasificación TNM es la variable que se correlaciona con mayor fuerza al pronóstico de sobrevida total y sobrevida libre de enfermedad, a diferencia de la diferenciación histológica [6,31].

## **BIOMARCADORES GENÉTICOS EN CÁNCER DE LARINGE**

Los principales factores de riesgo para CL identificados en la actualidad son el consumo de cigarrillo, consumo de alcohol, edad mayor a 65 años y antecedentes de familiares directos con CL. El estudio de los factores genéticos del paciente que influyen en el riesgo de desarrollar cáncer han generado creciente interés en la comunidad científica, con el objetivo de determinar biomarcadores que entreguen una mejor comprensión de los procesos involucrados en la génesis del cáncer en el individuo y que permitan definir futuros marcadores de susceptibilidad y blancos terapéuticos innovadores.

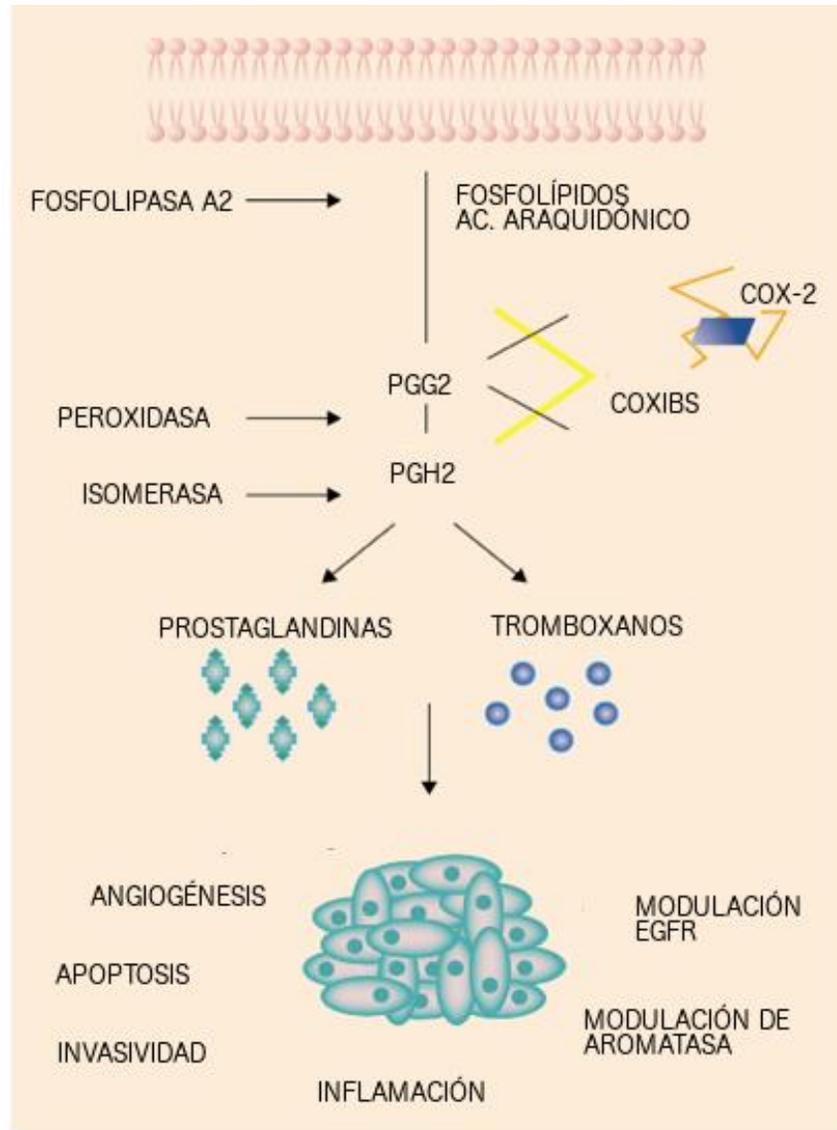
Dentro de los posibles candidatos a biomarcadores genéticos encontramos los polimorfismos de nucleótido único (SNP), los cuales pueden influir en el riesgo de cáncer mediante diversos mecanismos: producir el cambio de aminoácido en una proteína funcional, alterar un promotor o supresor de la expresión de un gen, alterar la estabilidad o el *splicing* del RNA mensajero son algunos ejemplos.

El epitelio de la laringe corresponde a un tejido altamente especializado con función de barrera, que se ve constantemente agredido por factores nocivos como polución, virus e incluso ácido estomacal. Mediadores de inflamación, supresores de tumores y factores mitogénicos involucrados en la proliferación y renovación de epitelios son vitales para la mantención de la integridad y homeostasis de este delicado tejido, pero también podrían, bajo ciertas circunstancias, participar del proceso de carcinogénesis, por lo que son blancos de interés para convertirse en potenciales biomarcadores de cáncer [24].

- **CICLOOXIGENASA 2**

La familia de enzimas ciclooxigenasas (COXs) están codificadas por el gen *PTGS2* y catalizan la conversión de ácido araquidónico en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) el cual es el primer paso en la síntesis de diversos prostanoides como PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>. Se han descrito tres grandes grupos en ésta familia de enzimas, COX-1, COX-2 y COX-3. La forma COX-1 es constitutiva en ciertos tejidos, como gastrointestinal, endotelial y renal. La forma COX-3 corresponde a una variante de *splicing* alternativo de la enzima COX-1 que se expresa exclusivamente en el SNC.

Por último, la forma COX-2 es inducible y por lo general sólo se encuentra en grandes cantidades en células bajo condiciones de injuria o inflamación. Estudios en pacientes con cáncer colorrectal y poliposis adenomatosa familiar han permitido observar que la inhibición de COX por AINES como aspirina y sulindaco puede desacelerar el proceso de progresión tumoral en estos pacientes, lo que sugiere que mecanismos dependientes de prostaglandinas también estarían participando en la génesis y progresión tumoral de este tipo de cáncer.



**Figura 5:** Esquema básico de la vía de señalización inflamatoria mediada por COX-2/PG señalando los mecanismos en los que se ha observado que participa en la carcinogénesis y supervivencia del tumor. Gasparini 2003 [16]

Se ha determinado que una mayor expresión de COX-2 disminuye la tasa de apoptosis en roedores, aumentando los niveles de PGE<sub>2</sub> y Bcl-2 favoreciendo la proliferación celular. Sumado a esto, la activación de receptores PPAR por prostaglandinas, el aumento de citoquinas con actividad proliferativa como IL-10 e IL-12, y la disminución de citoquinas con actividad anti-proliferativa como IL-1 y TNF mediados por PGE<sub>2</sub> podrían contribuir a los procesos de transformación maligna y crecimiento de tejido neoplásico [5,16].

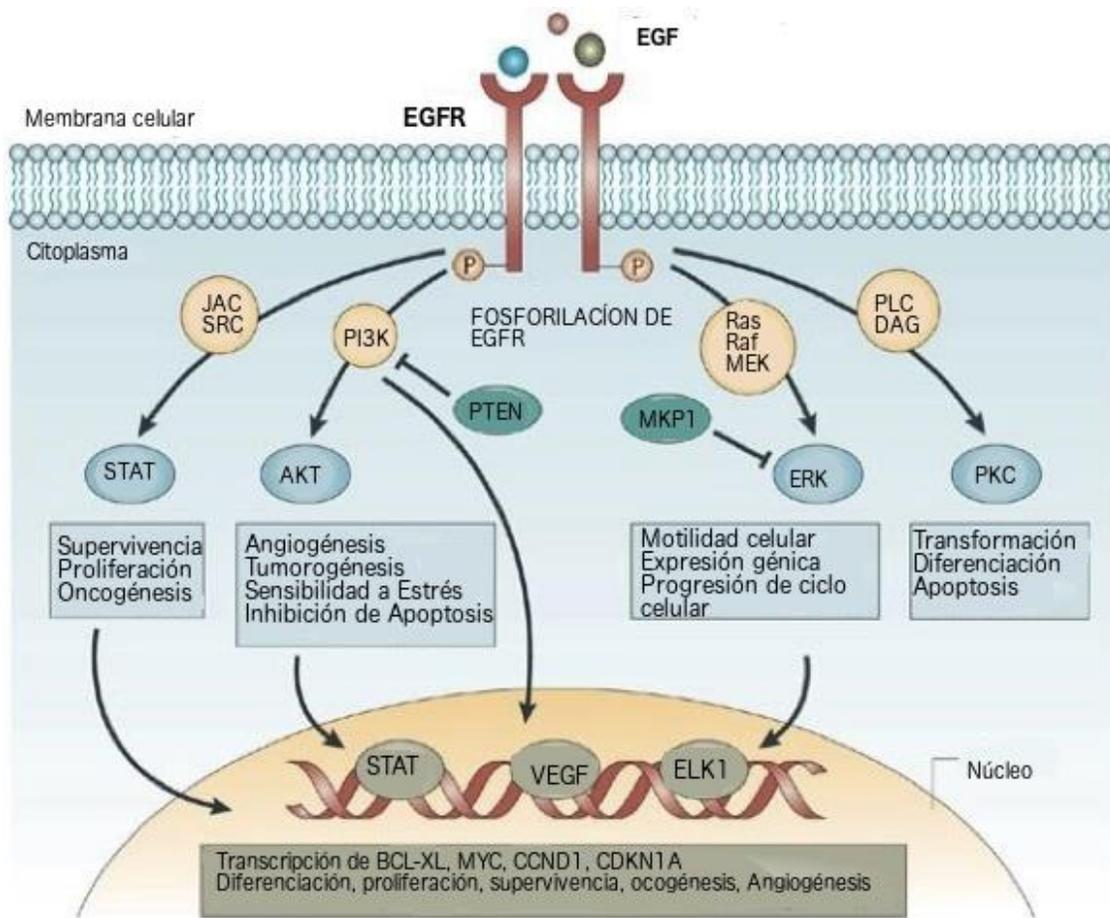
Los polimorfismos rs20417 y rs689466 del gen *PTGS-2* se encuentran en secuencias promotoras de este gen, en sitios de unión con factores de transcripción específicos, por lo cual podrían modificar su expresión influyendo en el riesgo de cáncer. En estudios de casos y controles se ha observado un mayor riesgo de cáncer de esófago en la población india y de cáncer gástrico en la población brasileña asociado al alelo C de la variante rs20417 (-765G>C, en posición -765 respecto al sitio de inicio de transcripción), y una relación entre el alelo A de la variante rs689466 (-1195 A>G, en posición -1195 respecto al sitio de inicio de transcripción) y el desarrollo de cáncer esofágico y cáncer gástrico de tipo difuso, lo cual apoyaría la hipótesis del impacto que tendrían estas variantes en el proceso de carcinogénesis [10,47,53].

#### • VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un potente factor mitogénico que cumple una función crucial en el desarrollo y diferenciación de diversos tipos celulares. EGF se une al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor tipo tirosina quinasa localizado en la superficie de distintos tipos de células epiteliales.

Al unirse a su ligando, el receptor EGFR dimeriza, se autofosforila y gatilla una serie de cascadas de señalización celular mediadas por Erk/MEK, Pi3K, JAK/STAT y otros, relacionadas con la migración, adhesión, diferenciación y proliferación de tejido epitelial. La activación desmesurada de este receptor está a su vez relacionada con el desarrollo de cáncer CECyC, cáncer de pulmón y carcinoma hepatocelular, entre otros, y es un factor que puede predecir un pronóstico de sobrevida desfavorable para el paciente e incluso hoy se emplea como blanco terapéutico de fármacos como Cetuximab.

Se ha descrito la variante rs4444903 del gen EGF en posición +61 respecto al sitio de inicio de transcripción, con sustitución de A>G. Corresponde a un SNP en la región 5' UTR, cuyo efecto es producir una expresión significativamente mayor de EGF en individuos que portan el alelo G de esta variante, la cual se asocia a peor pronóstico y sobrevida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (CECyC), y mayor riesgo de melanoma maligno. El mecanismo por el que esta variante aumenta la expresión de EGF aún no ha sido determinado [18,49].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Cancer

**Figura 6:** Esquema básico de las cascadas de señalización mitogénicas mediadas por EGF/EGFR indicando algunos de los mecanismos por los que participan en proliferación y carcinogénesis. Nature, 2006.

Para el receptor EGFR se ha descrito la variante rs2227983 (R521K G>A), en la cual se sustituye Arginina (nucleótido G) por Lisina (nucleótido A) en el sitio de unión a ligando, disminuyendo la afinidad por este y la actividad tirosina quinasa del receptor. Se ha observado en estudios de casos y controles un menor riesgo de cáncer colorrectal y de cáncer de faringo-laringe en individuos portadores de la variante que codifica para Lisina, y un mejor pronóstico de evolución clínica en los pacientes con cáncer que portan este alelo [49,50].

- **SUPRESOR DE TUMORES P53**

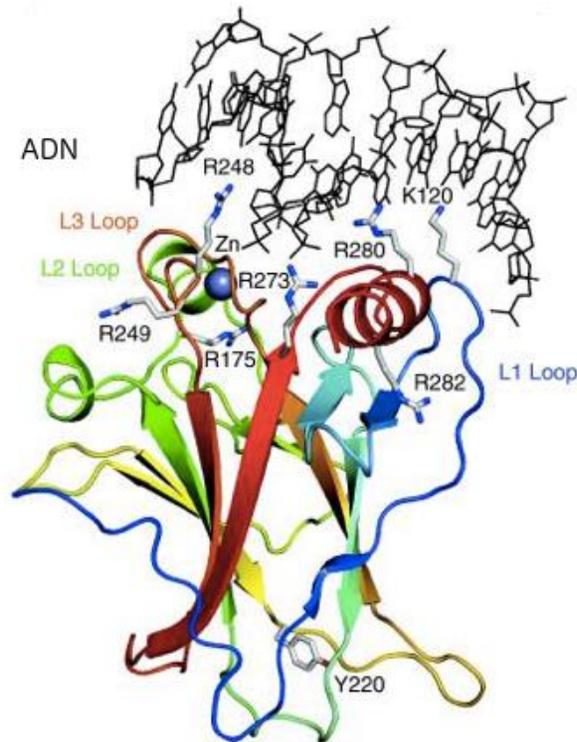
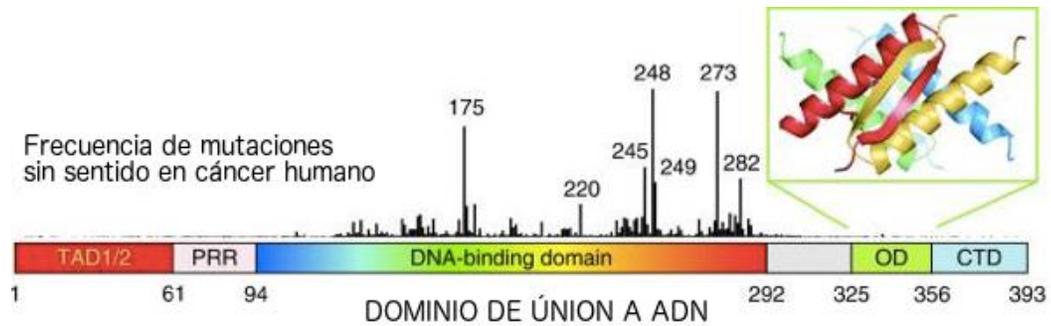
P53 es una proteína constitutiva de todas las células, que consta de 393 aminoácidos y está codificada por el gen *TP53*. Posee 3 dominios funcionales principales: un dominio de unión a ADN, un dominio de activación de factores de transcripción en posición amino terminal y un dominio de tetramerización en el carboxilo terminal.

P53 se une al ADN y en caso de que éste presente daño, regula negativamente el proceso de división celular, activando inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, deteniendo el ciclo de división celular en fase G1 o G2 y permitiendo que actúen los complejos celulares de reparación de ADN. En caso de que el daño en el material genético de la célula no pueda repararse, P53 es capaz de inducir la apoptosis de la célula mediante la estimulación de BAX y FAS y/o la represión de la expresión de Bcl-2.

Por lo tanto, la función de P53 es prevenir la división y supervivencia de células con ADN mutado, y es crítica en la prevención intrínseca del desarrollo de tumores. Alteraciones que significan un funcionamiento defectuoso de P53 suelen verse con frecuencia en cáncer de mama, vejiga, ovario, y en el síndrome de Li-Fraumeni, una enfermedad genética de tipo autosómico dominante en la que se ve afectada la función de P53, generalmente por mutaciones en el dominio de unión al ADN que no permiten que éste pueda identificar adecuadamente las zonas con ADN dañado, causando en estos pacientes una mayor predisposición a sufrir múltiples tipos de cáncer [37,52].

La variante rs1042522 es un SNP que produce la sustitución de un nucleótido de guanina (G) por citosina (C), lo que cambia el codón codificante en la posición 72 de la proteína de Arginina a Prolina en el dominio rico en prolina (aminoácidos 61 a 94).

Este SNP no altera la funcionalidad de los dominios más importantes de P53 y hasta el momento no se ha asociado a desarrollo de síndrome de Li-Fraumeni, pero si hay estudios que sugieren la asociación entre el alelo P53 codón 72 Pro y desarrollo de cáncer de próstata [21] y mal pronóstico en la evolución clínica de neuroblastoma [12] pero no en el caso de cáncer de ovario [1].

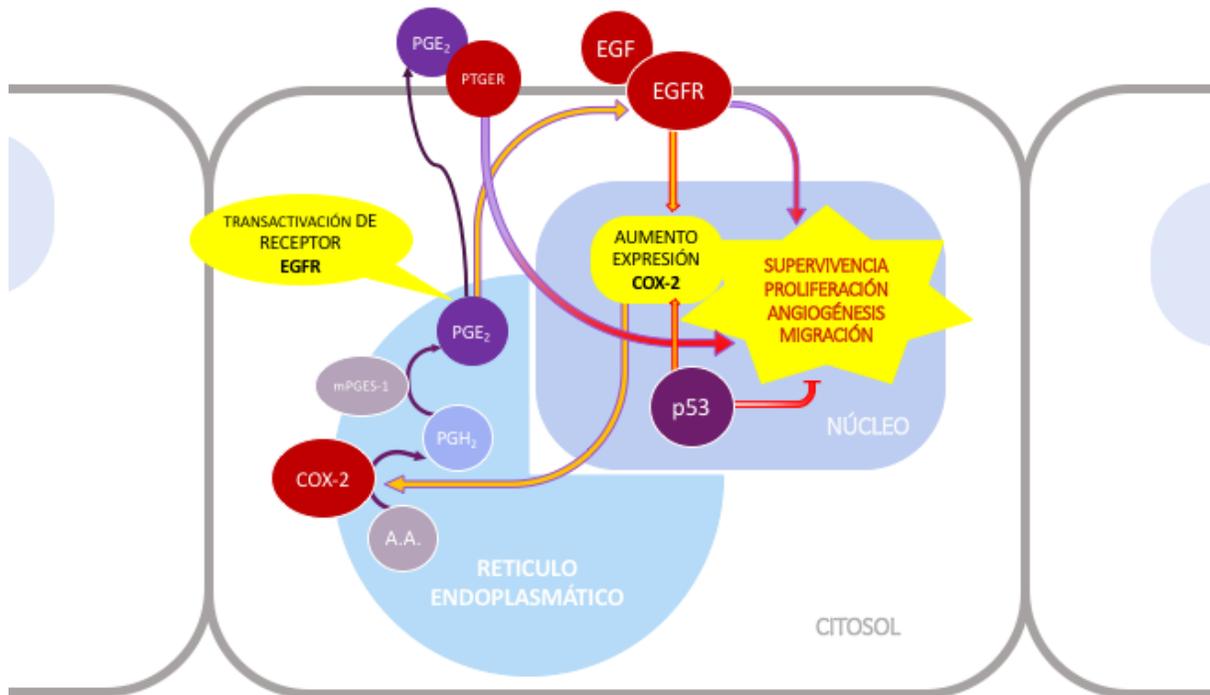


**Figura 7:** Estructura lineal y tridimensional de P53 detallando los dominios de la proteína. TAD: dominio de transactivación, PRR: dominio rico en prolina, DNA-Binding domain: dominio de unión a ADN, OD: dominio de tetramerización, CTD: dominio de regulación carboxilo terminal. Fuente: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010 [22].

Las variantes descritas para P53, COX 2, EGF y EGFR se han estudiado para diversos tipos de tumores malignos de forma independiente, sin embargo, genera interés el determinar si existe una interacción entre ellas que tenga influencia en el riesgo de desarrollo de cáncer de laringe.

Con anterioridad se ha estudiado el efecto de altas dosis de ibuprofeno sobre el perfil de expresión génica de células de adenocarcinoma gástrico, observándose una reducción en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, las cuales podrían estar mediadas o no por el efecto de inhibición de vías mediadas por COX-2 [8].

Por otra parte, se ha descrito una asociación entre la expresión de EGFR y la agresividad del cáncer de mama triple negativo, y una correlación entre mutaciones en P53 y una mayor expresión de EGFR, además de observarse mayor tasa de fracaso terapéutico con inhibidores de EGFR en pacientes con estas mutaciones [54].



**Figura 8:** Esquema de las interacciones observadas entre COX-2 EGF, EGFR y P53, y la contribución que podrían tener en el proceso de transformación maligna en cáncer de laringe. Este modelo representa una célula de tejido epitelial marcado por el rectángulo en gris. Las flechas de color rojo señalan las vías de señalización que contribuyen directamente a cáncer y las flechas de color naranja señalan las interacciones entre las distintas vías de señalización, por las cuales hipotéticamente podrían amplificarse y potenciar el proceso de carcinogénesis [1,5,10,12,16,18,22,27,38,49,50,53].

Se ha descrito que EGFR y P53 tienen efecto en la expresión de COX-2 y que ésta a su vez puede inducir la transactivación del receptor EGFR. Esto nos plantea la interrogante del verdadero impacto de la combinación de estos polimorfismos, que podrían darnos indicios respecto a la complejidad de mecanismos de comunicación y de señalización inter e intracelular, y el efecto que estas pueden tener en el proceso de la carcinogénesis y su evolución.

En la actualidad diversos proyectos de secuenciación de genomas completos a gran escala (1000Genomes, ExAc) han detectado las frecuencias de variantes de interés, las

que varían dependiendo de la ancestría de cada población. En la tabla N° 5 se detallan las frecuencias de cada SNP, detectadas en distintas etnias a nivel mundial.

**Tabla 5: Frecuencia de genotipos rs20417 y rs689466 de COX-2, rs4444903 de EGF, rs2227983 de EGFR y rs1042522 de P53 observados en distintos grupos étnicos**

Variante	Cambio de nucleótido/ aminoácido	Efecto en la proteína	AFR	AMR	EAS	EUR	SAS
rs20417 COX-2 -765 G>C	G>C	Aumento en la expresión de COX-2	C:0,650 G:0,351"	C:0,788 G:0,212"	C:0,957 G:0,043"	C:0,849 G:0,151"	C:0,811 G:0,189"
rs689466 COX-2 - 1195A>G	A>G	Aumento en la expresión de COX-2	A:0,921 G:0,079"	A:0,736 G:0,264"	A:0,518 G:0,482"	A:0,813 G:0,187"	A:0,868 G:0,132"
rs4444903 EGF +61 A>G	G>A	Aumento en la expresión de EGF	G:0,762 A:0,238"	G:0,581 A:0,419"	G:0,693 A:0,307"	A:0,609 G:0,391"	G:0,541 A:0,459"
<b>rs2227983</b> <b>EGFR</b> <b>R521K G&gt;A</b>	G>A Arg>Lys	Cambio en sitio de unión a ligando: disminuye afinidad	G:0,936 A:0,064"	G:0,670 A:0,330"	A:0,524 G:0,476"	G:0,724 A:0,275"	G:0,648 A:0,351"
rs1042522 P53 R72P G>C	C>G Arg>Pro	Cambio en la proporción apoptosis/arresto en G2	G: 0,616 C: 0,384*	C: 0,711 G: 0,288*	C: 0,589 G: 0,411*	C:0,665 G: 0,335*	G: 0,501 C: 0,499*

Frecuencia de genotipos rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 observados en distintos grupos étnicos. AFR: Población afroamericana, AMR: Población amerindia, EAS: Población de Asia Oriental, EUR: Población europea, SAS: Población de Asia del Sur Fuente (\*): Exome Aggregation Consortium Database, ("): 1000Genomes Database<sup>[32-36]</sup>.

De acuerdo a los antecedentes anteriormente descritos, el presente trabajo de tesis plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

## **HIPOTESIS**

Polimorfismos genéticos (rs20417 y rs689466 del gen *PTGS2* (COX-2), rs4444903 del gen del factor de crecimiento epidérmico, rs2227983 del gen del receptor de factor de crecimiento epidérmico y rs1042522 del gen *TP53*) se asocian, individualmente, en conjunto y/o en combinación con factores de riesgo ambientales, al riesgo de desarrollar carcinoma escamoso de laringe en la población chilena.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar asociaciones entre los polimorfismos rs20417 y rs689466 del gen *PTGS2*, rs4444903 del gen de EGF, rs2227983 del gen de EGFR y rs1042522 del gen *TP53*, en conjunto con factores de riesgo ambientales, y el riesgo de presentar cáncer de laringe en la población chilena.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 en un grupo de pacientes adultos con cáncer escamoso de laringe y un grupo de voluntarios sin diagnóstico de cáncer.
- Evaluar la influencia de estas variantes en el riesgo de cáncer escamoso de laringe en la población chilena en conjunto con el hábito tabáquico, consumo de alcohol y otros factores de riesgo.
- Evaluar la asociación entre los polimorfismos COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 y la mortalidad en el grupo de pacientes adultos con cáncer escamoso de laringe.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Caso y Control 1:1, observacional.

## 2. Pacientes en estudio:

Casos: Se trabajó con 100 pacientes adultos atendidos en el Servicio de Otorrinolaringología del Complejo Asistencial Barros Luco, con diagnóstico de cáncer escamoso de laringe con confirmación histológica diagnosticados en los últimos 10 años.

Controles: Se trabajó con un grupo de 139 controles conformado por 10 voluntarios adultos sin sospecha clínica ni nasofibros cópica de cáncer de laringe atendidos en el Servicio de Otorrinolaringología del Complejo Asistencial Barros Luco, 125 voluntarios sin cáncer y con diagnóstico de hiperplasia prostática benigna reclutados por la Corporación Nacional del Cáncer y 4 voluntarios sanos del banco de muestras del Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Universidad de Chile.

Clasificación de variables de exposición ambiental: para este estudio se definió como sujeto fumador a aquel que presenta un índice tabáquico (Birkman<sub>[9]</sub>) superior a 200, calculado como el número promedio de cigarrillos consumidos al día multiplicado por los años totales de consumo. Se consideró como consumidores de alcohol a aquellos sujetos que consumían más de 280 gramos de alcohol semanal para hombres, o más de 168 gramos semanal para mujeres. Se registro además la información sobre el sexo y la edad de los individuos participantes de este estudio.

## 3. Tamaño Muestral

Se determinó en base al diseño de estudio planteado utilizando el programa estadístico Open Epi. Como no existe literatura disponible respecto a la frecuencia de variante rs1042522 del codón 72 de P53 en pacientes con cáncer de laringe se utilizó prevalencia reportada para de cáncer escamoso de piel por Keith *et al.* (2012), la cual establece una frecuencia de la variante rs1042522 en controles de 41% y de 61% en el pacientes (O.R.: 2,81).

Basándonos en estas prevalencias de P53, se obtuvo un requerimiento mínimo de 82 pacientes por rama en una proporción de 1:1, por lo que la muestra total necesaria corresponde a 164 participantes (82 controles, 82 casos).

#### **4. Consentimiento informado**

Se solicitó a todos los pacientes en estudio firmar una carta explícita de consentimiento informado para ser incorporados en el presente estudio, el cual se realizó de acuerdo a lo éticamente aceptado internacionalmente según el Protocolo de Helsinki (Anexo 2).

#### **5. Criterios de inclusión**

- Casos: Pacientes adultos con cáncer escamoso de laringe diagnosticados en los últimos 10 años.
- Controles: Voluntarios adultos sin sospecha clínica de cáncer de laringe o de otro tipo.

#### **6. Criterios de exclusión**

- Pacientes con diagnóstico de cáncer de laringe no escamoso.
- Pacientes con sospecha de cáncer de laringe no confirmado histológicamente.
- Paciente con otros síndromes genéticos conocidos.
- Paciente control con antecedente de enfermedad maligna.
- Consumo de antiinflamatorios no esteroideos o aspirina dentro de la semana previa al examen.

#### **7. Aspectos éticos**

El protocolo de este estudio se encuentra aprobado por el Comité de Evaluación Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cuenta con la autorización del Hospital Barros Luco Trudeau, bajo la supervisión de la Dra. Maritza Rahal Espejo, Jefa de Servicio de Otorrinolaringología, con objeto de cumplir apropiadamente con la Declaración de Helsinki.

Este estudio se realiza en el marco de ampliar la evaluación de polimorfismos genéticos iniciada el 2007 y continuada el 2010 con los trabajos aceptados

previamente en los concursos de la Sociedad Chilena de Otorrinolaringología (Anexo 1).

En todos los procedimientos se respetaron rigurosamente las normativas nacionales e internacionales, que incluyen la Ley 20.120 que versa sobre la investigación científica en el ser humano y su genoma, las buenas prácticas clínicas (GCP) y la Ley de derechos y deberes del paciente (Ley 20.584).

## **8. Análisis de genotipo para variantes genéticas de COX-2, EGF, EGFR y P53**

Se realizó la extracción de muestras de ADN genómico de cada sujeto participante a partir de linfocitos obtenidos de sangre periférica mediante el uso de kit de extracción comercial (Omega Bio-tek).

A partir de estas muestras de ADN genómico se analizaron los genotipos para cada sujeto a través de PCR-RFLP, empleando las técnicas de Shin W. *et al* (2012) para la genotipificación de COX-2 rs20417 detallada en el Anexo 6 y para COX-2 rs689466 detallada en el Anexo 7, la técnica de Aráujo A. *et al*. (2011) para la genotipificación de la variante EGF rs4444903 detallada en el Anexo 8, la técnica de Mustafa O.H. (2013) para la genotipificación de la variante EGFR rs2227983 detallada en el Anexo 9 y la técnica de de la Calle M. *et al*. (1990) para la genotipificación de la variante P53 rs1042522 detallada en el Anexo 10.

Para la amplificación de fragmentos de PCR se utilizó la enzima *MyTaq Taq* ADN polimerasa (Bioline), tampones de amplificación incluidos en el kit comercial y partidores específicos para cada secuencia a amplificar.

La amplificación se realizó en un Termociclador G-Storm Modelo GS00482. El esquema de electroforesis de fragmentos de restricción según genotipo para COX-2 rs20417 se detalla en la figura 10 (Anexo 6), para COX-2 rs689466 se detalla en la figura 11 (Anexo 7), para EGF rs4444903 se detalla en la figura 12 (Anexo 8), para EGFR rs2227983 se detalla en la figura 13 (Anexo 9) y para P53 rs1042522 se detalla en la figura 14 (Anexo 10).

## 9. Análisis de datos

Se utilizó el software estadístico Stata versión 13.0, realizándose un análisis exploratorio de datos, describiendo las variables demográficas de la población estudiada, medidas de tendencia central y proporciones.

Se estimaron posibles asociaciones mediante modelos de regresión logística para el análisis bivariado y multivariado, estimando los *Odds Ratio* (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC), ajustando por edad, sexo, consumo de tabaco y alcohol, y se seleccionó el modelo que mejor representara la interacción entre las variables y el riesgo de cáncer de laringe considerando el valor de Pseudo  $R^2$  más cercano a 1 y un valor de P del modelo menor a 0,05 como medidas de bondad de ajuste para cada modelo de regresión logística, indicando que el modelo es capaz de explicar una mayor proporción del riesgo de CL y se ajusta mejor a los datos observados. Para los polimorfismos genéticos se evaluaron y compararon distintos modelos de herencia genética (dominante, recesivo y de co-dominancia), para determinar qué modelo representa mejor la interacción entre el gen y el riesgo de cáncer de laringe según su medida de bondad de ajuste.

Se realizó la comparación de subgrupos de nuestras variables utilizando los test t-test para las variables continuas dependiendo si distribuyen o no normal respectivamente, y se utilizó el test Chi-cuadrado para la comparación de grupos que consideren variables categóricas. Para el análisis de desequilibrio de ligamiento se utilizó el software estadístico PLINK versión 1.07. En todos los análisis se consideró una probabilidad de error tipo 1  $\alpha$  igual o menor a 0,05 como el criterio de significación estadística.

## RESULTADOS

### 1. Características de la población de estudio

En la tabla N° 6 se presentan las características demográficas de los grupos de estudio analizados.

**Tabla 6: Características generales de la población de estudio**

	Pacientes (casos)	Voluntarios (Controles)	P value
N° de sujetos	100	139	
Edad promedio (I.C 95%)	64,25 (61,8 – 66,7)	65,2 (63,6 – 66,9)	0,461
N.D.	16	27	
<b>Sexo</b>			
Masculino	89 (89,9%)	135 (97,1%)	0,021
Femenino	10 (10,1%)	4 (2,9%)	
N.D.	1	0	
Fumador	66 (78,6%)	34 (30,6%)	<0,001
N.D.	16	28	
Bebedor	37 (38,9%)	24 (21,2%)	0,006
N.D.	5	26	
Pacientes H. Barros Luco	100 (100%)	10 (7,2%)	
Voluntarios H.P.B CONAC	-	125 (89,9%)	
Voluntarios sanos de BIOBANCO C.Q.F.	-	4 (2,8%)	

Características generales de la población de estudio. (N.D.: cantidad de muestras sin información), Pacientes H. Barros Luco: pacientes atendidos en el Hospital Barros Luco con o sin cáncer; Voluntarios H.P.B CONAC: voluntarios sin cáncer diagnosticados con hiperplasia prostática benigna atendidos en la Corporación Nacional del Cáncer CONAC; Voluntarios sanos de BIOBANCO C.Q.F.: voluntarios sanos del Biobanco de muestras del Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Universidad de Chile.

#### 1.1. Etapificación del cáncer y tratamiento en pacientes con cáncer de laringe

Los datos del estado patológico del cáncer en la población de pacientes incluidos en este estudio y la terapia dirigida contra el cáncer seleccionada para el paciente al momento del enrolamiento en el estudio (n=100) se presentan en la tabla N° 39 (Anexo 11).

## 2. Genotificación de polimorfismos analizados

En la tabla N° 40 (Anexo 12) se presentan la cantidad y porcentaje de de muestras genotificadas para cada variante en cada grupo de estudio. Finalmente se obtuvo un total 100 pacientes con cáncer de laringe y 111 voluntarios totalmente genotificados, ya que en el grupo de controles parte de las muestras no pudo ser genotificada por agotamiento de las muestras de ADN, degradación del ADN o por pérdida de la muestra.

## 3. Frecuencia genóticas y alélicas para las variantes analizadas

En la tabla N° 7 se presentan las frecuencias de genotipo y frecuencias alélicas para cada polimorfismo analizado en la población de pacientes CL y la población de controles.

**Tabla 7: Frecuencia genotípica y alélica para variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522**

	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
<b>COX-2 rs20417 (-765 G&gt;C)</b>					
	G/G	G/C	C/C	G	C
Pacientes CL (n=100)	57 (57,0%)	39 (39,0%)	4 (4,0%)	153 (76,50%)	47 (23,50%)
Voluntarios sanos (n=126)	87 (69,05%)	37 (29,37%)	2 (1,59%)	211 (83,73%)	41 (16,27%)
<b>COX-2 rs689466 (-1195A&gt;G)</b>					
	A/A	A/G	G/G	A	G
Pacientes CL (n=100)	62 (62,0%)	24 (24,0%)	14 (14,0%)	148 (74,0%)	52 (26,0%)
Voluntarios sanos (n=126)	50 (39,68%)	63 (50,00%)	13 (10,32%)	163 (64,68%)	89 (35,32%)
<b>EGF rs4444903 (+61 A&gt;G)</b>					
	G/G	G/A	A/A	G	A
Pacientes CL (n=100)	22 (22,0%)	53 (53,0%)	25 (25,0%)	97 (48,50%)	103 (51,50%)
Voluntarios sanos (n=128)	43 (33,59%)	65 (50,78%)	20 (15,63%)	151 (58,98%)	105 (41,02%)
<b>EGFR rs2227983 (R521K G&gt;A)</b>					
	G/G	G/A	A/A	G	A
Pacientes CL (n=100)	53 (53,0%)	41 (41,0%)	6 (6,0%)	147 (73,50%)	53 (26,50%)
Voluntarios sanos (n=134)	79 (58,96%)	45 (33,58%)	10 (7,46%)	203 (75,75%)	65 (24,25%)
<b>P53 rs1042522 (R72P G&gt;C)</b>					
	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	G/G	G/C	C/C	G	C
Pacientes CL (n=100)	52 (52,0%)	46 (46,0%)	2 (2,0%)	150 (75,0%)	50 (25,0%)
Voluntarios sanos (n=121)	76 (62,81%)	39 (32,23%)	6 (4,96%)	191 (78,93%)	51 (21,07%)

Frecuencia genotípica y alélica para variantes rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 observados en las distintas poblaciones estudiadas.

#### 4. Comparación de frecuencias alélicas con otros grupos étnicos

En la tabla N° 8 se presentan las frecuencias alélicas para cada polimorfismo analizado en paralelo con las frecuencias alélicas observadas en distintas etnias para cada variante, determinadas en proyectos de secuenciación de genomas humanos a gran escala (*1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium Database*). Algunas de las frecuencias alélicas no necesariamente son similares a las frecuencias reportadas para la población amerindia (AMR) o caucásica (EUR).

**Tabla 8: Frecuencia de genotipos COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 observada en el grupo de control y comparada con frecuencias observadas en otras poblaciones**

Variante	Pacientes CL	Controles estudio	AFR	AMR	EAS	EUR	SAS
rs20417 COX-2 -765 G>C	<b>G: 0,7650</b> <b>C: 0,2350</b>	<b>G: 0,8373</b> <b>C: 0,1627</b>	C:0,650 G: 0,351 <sup>''</sup>	C:0,788 G:0,212 <sup>''</sup>	C:0,957 G:0,043 <sup>''</sup>	C:0,849 G:0,151 <sup>''</sup>	C:0,811 G:0,189 <sup>''</sup>
rs689466 COX-2 -1195A>G	<b>A: 0,7400</b> <b>G: 0,2600</b>	<b>A: 0,6468</b> <b>G: 0,3532</b>	A:0,921 G:0,079 <sup>''</sup>	A:0,736 G:0,264 <sup>''</sup>	A:0,518 G:0,482 <sup>''</sup>	A:0,813 G:0,187 <sup>''</sup>	A:0,868 G:0,132 <sup>''</sup>
rs4444903 EGF +61 A>G	<b>G: 0,4850</b> <b>A: 0,5150</b>	<b>G: 0,5898</b> <b>A: 0,4102</b>	G:0,762 A:0,238 <sup>''</sup>	G:0,581 A:0,419 <sup>''</sup>	G:0,693 A:0,307 <sup>''</sup>	A:0,609 G:0,391 <sup>''</sup>	G:0,541 A:0,459 <sup>''</sup>
rs2227983 EGFR R521K G>A	<b>G: 0,7350</b> <b>A: 0,2650</b>	<b>G: 0,7575</b> <b>A: 0,2425</b>	G:0,936 A:0,064 <sup>''</sup>	G:0,670 A:0,330 <sup>''</sup>	A:0,524 G:0,476 <sup>''</sup>	G:0,724 A:0,275 <sup>''</sup>	G:0,648 A:0,351 <sup>''</sup>
rs1042522 P53 R72P G>C	<b>G: 0,7500</b> <b>C: 0,2500</b>	<b>G: 0,7893</b> <b>C: 0,2107</b>	G: 0,616 C: 0,384*	C: 0,711 G: 0,288*	C: 0,589 G: 0,411*	C:0,665 G: 0,335*	G: 0,501 C: 0,499*

Frecuencia de genotipos rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 observada en el grupo de control y comparada con frecuencias observadas en otras poblaciones. AFR: Población afroamericana, AMR: Población amerindia, EAS: Población de Asia Oriental, EUR: Población europea, SAS: Población de Asia del Sur. Fuente: (\*) *Exome Aggregation Consortium Database*, (") *1000Genomes Database*. [32-36]

#### 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg

En la tabla N°42 (Anexo 13) se presentan los resultados de equilibrio de Hardy-Weinberg para el grupo de voluntarios de este estudio. Todos los polimorfismos analizados se encuentran en equilibrio de H.W. en la muestra de voluntarios con una probabilidad de error  $\alpha$  menor a 0,05.

## 6. Análisis bivariado de asociación entre factores ambientales y riesgo de cáncer de laringe

En la tabla N° 9 se detalla el análisis del *Odds Ratio* calculado para los factores de riesgo ambientales conocidos para cáncer de laringe en la muestra estudiada, destacando los resultados que fueron estadísticamente significativos para el riesgo de cáncer de laringe (valor  $p < 0,05$ ).

**Tabla 9: Análisis bivariado de riesgo de cáncer de laringe según factores ambientales**

Factor de riesgo		N casos	N controles	OR	Intervalo de confianza (95%)	P value.	Pseudo R <sup>2</sup>	P value. modelo
Consumo de cigarro	+	66	34	8,304	4,296 – 16,052	<0,001	0,1731	<0,0001
	-	18	77	1	Referencia			
Consumo de alcohol	+	37	24	2,365	1,284 – 4,358	0,006	0,0273	0,0052
	-	58	89	1	Referencia			
Sexo masculino	+	89	135	0,264	0,080 – 0,866	0,028	0,0168	0,0200
	-	10	4	1	Referencia			
Edad mayor a 65 años	+	46	54	1,300	0,737 – 2,293	0,365	0,0031	0,3639
	-	38	58	1	Referencia			

Análisis bivariado de riesgo de cáncer de laringe según los factores ambientales conocidos por literatura: Consumo de cigarro, consumo de alcohol, sexo masculino y edad mayor a 65 años.

Según estos resultados se observa que el factor de riesgo que más se asocia a desarrollo de CL es el consumo de cigarro, seguido por una asociación de menor impacto con el consumo de alcohol. Inesperadamente, se observa el factor sexo masculino se comporta como un factor protector de riesgo de CL en las poblaciones estudiadas, lo cual es atribuible a la baja proporción de mujeres en el grupo de controles.

## 7. Análisis bivariado de asociación entre SNPs y riesgo de cáncer de laringe

En la tabla N° 10 se presenta el resultado del *Odds Ratio* calculado para cada variante de forma individual considerando los 3 modelos de herencia genética posibles. Se destacaron los resultados que fueron estadísticamente significativos para el riesgo de cáncer de laringe (valor  $p < 0,05$ ). Se considero para todos los casos al alelo de menor riesgo de cáncer como el alelo de referencia para los análisis estadísticos, independiente del hecho de ser el alelo de mayor o menor frecuencia.

**Tabla 10: Análisis bivariado de riesgo según distintos modelos de penetrancia para COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 observados en las distintas poblaciones estudiadas**

Modelo	Genotipo	N casos	N controles	OR	Intervalo de confianza (95%)	P Value	Pseudo R <sup>2</sup>	P Value modelo
<b>COX-2 rs20417 (-765 G&gt;C)</b>								
<b>CO-DOM.</b>	G/G	57	87	1	Referencia		0,0130	0,1333
	G/C	39	37	1,609	0,919 – 2,817	0,096		
	C/C	4	2	3,053	0,541 – 17,22	0,206		
<b>DOM.</b>	G/G	57	87	1	Referencia		0,0113	0,0616
	G/C + C/C	43	39	1,683	0,974 – 2,904	0,062		
<b>RECES.</b>	G/G + G/C	96	124	1	Referencia		0,0040	0,2626
	C/C	4	2	2,583	0,463 – 14,40	0,279		
<b>COX-2 rs689466 (-1195A&gt;G)</b>								
<b>CO-DOM.</b>	G/G	14	13	1	Referencia		0,0530	<b>0,0003</b>
	<b>A/G</b>	<b>24</b>	<b>63</b>	<b>0,354</b>	<b>0,145 – 0,861</b>	<b>0,022</b>		
	A/A	62	50	1,151	0,496 – 2,672	0,743		
<b>DOM.</b>	G/G	14	13	1	Referencia		0,0023	0,3982
	A/G + A/A	86	113	0,707	0,316 – 1,581	0,398		
<b>RECES.</b>	G/G + A/G	38	76	1	Referencia		0,0361	<b>0,0008</b>
	<b>A/A</b>	<b>62</b>	<b>50</b>	<b>2,480</b>	<b>1,447 – 4,250</b>	<b>0,001</b>		
<b>EGF rs4444903 (+61 A&gt;G)</b>								
<b>CO-DOM.</b>	G/G	22	43	1	Referencia		0,0168	0,0728
	G/A	53	65	1,593	0,850 – 2,989	0,146		
	<b>A/A</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>2,443</b>	<b>1,119 – 5,334</b>	<b>0,025</b>		
<b>DOM.</b>	G/G	22	43	1	Referencia		0,0120	0,0525
	G/A + A/A	78	86	1,794	0,985 – 3,264	0,056		
<b>RECES.</b>	G/G + G/A	75	108	1	Referencia		0,0099	0,0786
	A/A	25	20	1,8	0,933 – 3,474	0,080		
<b>EGFR rs2227983 (R521K G&gt;A)</b>								
<b>CO-DOM.</b>	A/A	6	10	1	Referencia		0,0044	0,4981
	G/A	41	45	1,518	0,507 – 4,548	0,455		
	G/G	53	79	1,118	0,383 – 3,261	0,838		
<b>DOM.</b>	A/A	6	10	1	Referencia		0,0006	0,6592
	G/A + G/G	94	124	1,263	0,443 – 3,599	0,662		
<b>RECES.</b>	A/A + G/A	47	55	1	Referencia		0,0026	0,3637
	G/G	53	79	0,785	0,466 – 1,323	0,364		
<b>P53 rs1042522 (R72P G&gt;C)</b>								
<b>CO-DOM.</b>	G/G	52	76	1	Referencia		0,0171	0,0743
	G/C	46	39	1,724	0,991 – 2,999	0,054		
	C/C	2	6	0,487	0,095 – 2,508	0,390		
<b>DOM.</b>	G/G	52	76	1	Referencia		0,0086	0,1052
	G/C + C/C	48	45	1,559	0,910 – 2,671	0,106		
<b>RECES.</b>	G/G + G/C	98	115	1	Referencia		0,0048	0,2281
	C/C	2	6	0,391	0,077 – 1,982	0,257		

**Tabla 10:** Análisis bivariado de riesgo según distintos modelos de penetrancia para rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 observados en las distintas poblaciones estudiadas. OR: *Odds Ratio*, CO-DOM: modelo de co-dominancia, DOM: modelo dominante, RECES: modelo recesivo.

Mediante este análisis se determinó que existe relación de riesgo de cáncer de laringe estadísticamente significativa asociada al genotipo homocigoto de riesgo A/A (modelo recesivo) para COX-2 rs689466 (O.R.: 2,48, I.C.95%: 1,447 – 4,250, *p value*: 0,001), al genotipo A/A de EGF rs4444903 (O.R.: 2,44, I.C.95%: 1,119 – 5,334, *p value*: 0,025), y una asociación de protección para el genotipo A/G de COX-2 rs689466 (O.R.: 0,354, I.C.95%: 0,145 – 0,861, *p value*: 0,022).

Para otras variantes algunos resultados estuvieron bastante cerca del criterio de significación estadística (COX-2 rs20417 modelo dominante O.R.: 1,683, I.C.95%: 0,974 – 2,904, *p value*: 0,062; P53 rs1042522 genotipo heterocigoto, modelo de co-dominancia O.R.:1,724, I.C.95%: 0,991 – 2,999, *p value*: 0,054; EGF rs4444903 modelo dominante O.R.: 1,794, I.C.95%: 0,985 – 3,264, *p value*: 0,056). Es probable que la capacidad de detección para las asociaciones entre estos SNP y el riesgo de CL mejore con un tamaño de muestra mayor.

## **8. Análisis multivariado de riesgo**

Se realizó el análisis multivariado para evaluar la asociación entre las variables combinadas y el riesgo de cáncer de laringe, el cual se presenta en la tabla N° 11. Se consideraron las variables fisiológicas asociadas a cáncer de laringe según literatura (sexo, consumo de cigarro, consumo de alcohol) y las variantes genéticas de interés según el modelo de herencia se ajusta mejor a los datos observados y es capaz de explicar una mayor proporción del riesgo de CL.

Al realizar el análisis de riesgo multivariado se observan cambios en el comportamiento de riesgo de algunas variables comparado con lo que se observa en el análisis bivariado. Por ejemplo en el modelo bivariado el genotipo homocigoto C/C de P53 rs1042522 se comporta como un factor protector, y en cambio se comporta como un factor de riesgo cuando se considera dentro del contexto del modelo multivariado (C/C vs. G/G O.R.: 0,487 bivariado, vs. O.R.: 2,777 multivariado).

También se observa un leve aumento del riesgo asociado a la variante EGF rs4444903 (modelo dominante O.R.: 1,794 bivariado vs. O.R.: 1,999 multivariado), mientras que en el caso de la variante COX-2 rs689466 ambos *Odds Ratio* disminuyen al nivel de comportarse como factores protectores (genotipo A/G vs. G/G O.R.: 0,354 en modelo

bivariado vs. O.R.: 0,124 en modelo multivariado; genotipo A/A vs. G/G O.R.: 1,151 en modelo bivariado vs. O.R.: 0,538 en modelo multivariado).

Dentro de los factores ambientales, el consumo de tabaco es el que muestra el mayor cambio en el comportamiento de riesgo entre el modelo bivariado y multivariado (O.R.: 8,304 bivariado vs. O.R.: 10,31 multivariado, *p value* <0,001, aumento de riesgo de 24%).

Tabla 11: Análisis multivariado de riesgo según variantes genéticas y factores ambientales				
P <i>value</i> modelo		<0,001		
Pseudo R <sup>2</sup> (R <sup>2</sup> de McFadden)		0,2903		
Numero de observaciones		170		
Variable	O.R.	I.C. 95%	P <i>Value</i>	β
<b>Sexo</b>	<b>0,060</b>	<b>0,006 – 0,632</b>	<b>0,019</b>	<b>-2,8050</b> <b>(-5,1504 – -0,4596)</b>
<b>Consumo de cigarro</b>	<b>10,31</b>	<b>4,361 – 24,38</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,3332</b> <b>(1,4726 – 3,1934)</b>
Consumo de alcohol	1,944	0,838 – 4,508	0,121	0,6647 (-0,1764 – 1,5059)
COX-2 rs20417 (-765G>C) presencia de alelo C	1,350	0,593 – 3,076	0,474	0,3007 (-0,5222 – 1,1235)
<b>COX-2 rs689466 (-1195A&gt;G)</b>				
<b>Genotipo A/G</b>	<b>0,124</b>	<b>0,031 – 0,509</b>	<b>0,004</b>	<b>-2,0801</b> <b>(-3,4846 – -0,6766)</b>
Genotipo A/A	0,538	0,145 – 2,001	0,355	-0,6191 (-1,9320 – 0,6938)
EGF rs4444903 (+61 A>G) presencia de Alelo A	1,999	0,854 – 4,682	0,111	0,6928 (-0,1582 – 1,5438)
<b>EGFR rs2227983 (R521K G&gt;A)</b>				
Genotipo G/A	1,579	0,376 – 6,626	0,532	0,4571 (-0,9768 – 1,8910)
Genotipo G/G	1,153	0,283 – 4,702	0,843	0,1420 (-1,2640 – 1,5479)
<b>P53 rs1042522 (R72P G&gt;C)</b>				
Genotipo G/C	1,639	0,751 – 3,579	0,215	0,4941 (-0,2868 – 1,2752)
Genotipo C/C	2,777	0,199 – 38,63	0,477	1,0215 (-1,6112 – 3,6543)
constante β <sub>0</sub>	3,120	0,210 – 46,27	0,473	1,0914 (-1,8889 – 4,0717)

Análisis multivariado de riesgo entre las variables ambientales sexo, consumo de tabaco y consumo de alcohol, y factores genéticos COX-2 rs20417 (DOM), COX-2 rs689466 (CO-DOM), EGF rs4444903 (DOM), EGFR rs2227983 (CO-DOM), P53 rs1042522 (CO-DOM).

Con la información obtenida de los coeficientes de regresión logística para cada variable es posible construir un modelo predictivo, el cual permite explicar el 29,03% del riesgo de cáncer de laringe en los grupos de estudio, según el Pseudo R2 obtenido en el resultado.

El modelo predictivo obtenido de la regresión logística que se obtiene es el siguiente:

$$\text{Ln(RiesgoCL)} = -2,8050 * (\text{Sexo}) + 2,3332 * (\text{Cigarro}) + 0,6647 * (\text{Alcohol}) + 0,3007 * (\text{COX-2 rs20417 alelo C}) - 2,0801 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/G}) - 0,6191 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/A}) + 0,6928 * (\text{EGF rs4444903 alelo A}) + 0,4571 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/A}) + 0,1420 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/G}) + 0,4941 * (\text{P53 rs1042522 genotipo G/C}) + 1,0215 * (\text{P53 rs1042522 genotipo C/C}) + 1,0914$$

Según este modelo, podemos expresar la probabilidad de riesgo de CL a través de la siguiente expresión:

$$P(\text{CL}) = \frac{e^{\{-2,8050 * (\text{Sexo}) + 2,3332 * (\text{Cigarro}) + 0,6647 * (\text{Alcohol}) + 0,3007 * (\text{COX-2 rs20417 alelo C}) - 2,0801 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/G}) - 0,6191 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/A}) + 0,6928 * (\text{EGF rs4444903 alelo A}) + 0,4571 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/A}) + 0,1420 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/G}) + 0,4941 * (\text{P53 rs1042522 genotipo G/C}) + 1,0215 * (\text{P53 rs1042522 genotipo C/C}) + 1,0914\}}{1 + e^{\{-2,8050 * (\text{Sexo}) + 2,3332 * (\text{Cigarro}) + 0,6647 * (\text{Alcohol}) + 0,3007 * (\text{COX-2 rs20417 alelo C}) - 2,0801 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/G}) - 0,6191 * (\text{COX-2 rs689466 genotipo A/A}) + 0,6928 * (\text{EGF rs4444903 alelo A}) + 0,4571 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/A}) + 0,1420 * (\text{EGFR rs2227983 genotipo G/G}) + 0,4941 * (\text{P53 rs1042522 genotipo G/C}) + 1,0215 * (\text{P53 rs1042522 genotipo C/C}) + 1,0914\}}$$

## 9. Análisis de interacción entre variantes genéticas y consumo de tabaco

A través de el análisis estratificado de los datos de consumo de tabaco entre los grupos y las distintas variantes genéticas se puede visualizar la interacción entre factores del ambiente (exposición a carcinógenos de tabaco y alcohol) y factores genéticos (las variantes genéticas analizadas en este estudio).

Como referencia se debe considerar que el riesgo asociado al consumo de cigarro corresponde a un O.R. de 8,304 (I.C.95%: 4,295 – 16,053; *p value*: <0,001) tal y como se detalló previamente en la tabla N° 9. La interacción entre consumo de cigarro y COX-2 rs20417 se describe en la tabla N° 12, la interacción con COX-2 rs689466 se describe en la tabla N° 13, la interacción con EGF rs4444903 se describe en la tabla N° 14, la interacción con EGFR rs2227983 se describe en la tabla N° 15 y la interacción con P53 rs1042522 se describe en la tabla N° 16.

**Tabla 12: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y COX-2 rs20417 (-765G>C)**

P value modelo: &lt;0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1583

Numero de observaciones: 185

Presencia alelo C	Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	<b>Cigarro</b>	<b>26</b>	<b>10</b>	<b>11,18</b>	<b>4,102 – 30,47</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	<b>Cigarro</b>	<b>49</b>	<b>24</b>	<b>7,167</b>	<b>3,050 – 16,83</b>	<b>&lt;0,001</b>
+	-	8	24	1,43	0,499 – 4,118	0,504
-	-	10	43	1	Referencia	
<b>Total</b>		<b>84</b>	<b>101</b>			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y el modelo dominante para la variante rs20417 (-765G>C) del gen COX-2, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 13: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y COX-2 rs689466 (-1195A>G)**

P value modelo: &lt;0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1974

Numero de observaciones: 185

Homocigoto A/A	Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	<b>Cigarro</b>	<b>43</b>	<b>12</b>	<b>20,47</b>	<b>7,334 – 57,17</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	<b>Cigarro</b>	<b>23</b>	<b>21</b>	<b>6,25</b>	<b>2,308 – 16,97</b>	<b>&lt;0,001</b>
+	-	11	28	2,24	0,775 – 6,502	0,136
-	-	7	40	1	Referencia	
<b>Total</b>		<b>84</b>	<b>101</b>			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y el modelo recesivo para la variante rs89466 (-1195A>G) del gen COX-2, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 14: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y EGF rs4444903 (+61 A>G)**

P value modelo: &lt;0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1738

Numero de observaciones: 187

Presencia alelo A	Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	<b>Cigarro</b>	<b>51</b>	<b>22</b>	<b>13,320</b>	<b>4,206 – 43,92</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	<b>Cigarro</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>7,840</b>	<b>1,949 – 27,48</b>	<b>0,003</b>
+	-	14	46	1,75	0,517 – 5,92	0,368
-	-	4	23	1	Referencia	
<b>Total</b>		<b>84</b>	<b>102</b>			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y el modelo dominante para la variante rs4444903 (+61 A>G) de EGF, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 15: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

P *value* modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1669

Numero de observaciones: 190

Homocigoto G/G	Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro	32	20	6,200	2,380 – 16,15	<0,001
-	Cigarro	34	14	9,411	3,477 – 25,47	<0,001
+	-	10	41	0,945	0,334 – 2,674	0,915
-	-	8	31	1	Referencia	
Total		84	106			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y el modelo recesivo para la variante rs2227983 (R521K G>A) de EGFR, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 16: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco y P53 rs1042522 (R72P G>C)**

P *value* modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1572

Numero de observaciones: 180

Presencia alelo C	Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro	33	10	12,54	4,464 – 33,85	<0,001
-	Cigarro	33	24	5,225	2,183 – 12,51	<0,001
+	-	8	23	1,321	0,456 – 3,830	0,607
-	-	10	38	1	Referencia	
Total		84	95			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y el modelo dominante para la variante rs1042522 (R72P G>C) de P53, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

El resultado es que las variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, y P53 rs1042522 aumentan de forma significativa el riesgo de cáncer de laringe asociado al consumo de tabaco (Consumo de cigarro O.R.: 8,304; Cigarro y Alelo C para COX-2 rs20417 O.R.: 11,18, aumento de riesgo 34,6%; Cigarro y Homocigoto A/A para COX-2 rs689466 O.R.: 20,47, aumento de riesgo 146,5%; Cigarro y Alelo A para EGF rs4444903 O.R.: 13,32, aumento de riesgo 60,4%; Cigarro y Alelo C para P53 rs1042522 O.R.: 12,54, aumento de riesgo de 51,0%), pero no para EGFR rs2227983 (Cigarro y EGFR rs2227983 Homocigoto A/A O.R.: 6,2), lo que indica que las cuatro primeras variantes tienen un efecto modificador de riesgo, es decir que son factores capaces de aumentar la susceptibilidad del individuo en presencia del principal factor causal de cáncer (consumo

de cigarro), y que el efecto en el riesgo de la variante por si sola es bastante discreto al no estar expuesto este factor de riesgo.

## 10. Análisis de interacción entre variantes genéticas y el consumo combinado de cigarro y alcohol

En el siguiente análisis se busca evaluar la sinergia entre la exposición a cigarro y alcohol y el efecto que tiene la presencia de cada una de las variantes genéticas estudiadas en el riesgo de cáncer de laringe.

Para esto se clasificó los datos en tres grupos: sujetos sin factores de riesgo, consumidores de cigarro y consumidores de cigarro y alcohol, omitiendo a los individuos que declararon consumo de alcohol pero no de cigarro. En la tabla N° 17 se observa que se reproduce la tendencia esperada de un aumento en el riesgo combinando el consumo de ambos carcinógenos, ya que según este análisis al combinar el consumo de cigarro y alcohol el *Odds Ratio* aumenta de 6,54 a 21,11 (*p value* <0,001).

**Tabla 17: Interacción Cigarro y Alcohol**

P Value modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,2027

Numero de observaciones: 174

Factor de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
Cigarro + Alcohol	27	6	21,11	7,256 – 61,45	<0,001
Cigarro	39	28	6,536	3,024 – 14,13	<0,001
-	13	61	1	Referencia	
	79	95			

Análisis de la interacción entre la combinación de consumo de tabaco y alcohol sobre el riesgo de cáncer de laringe.

La interacción cigarro/alcohol sobre el riesgo de cáncer de laringe en combinación con COX-2 rs20417 se describe en la tabla N° 18, la interacción con COX-2 rs689466 se describe en la tabla N° 19, la interacción con EGF rs4444903 se describe en la tabla N° 20, la interacción con EGFR rs2227983 se describe en la tabla N° 21 y la interacción con P53 rs1042522 se describe en la tabla N° 22.

**Tabla 18: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y COX-2 rs20417 (-765G>C)**

P value modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1917

Numero de observaciones :167

Presencia Alelo C	Factores de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro + Alcohol	11	2	<b>28,28</b>	<b>5,627 – 169,23</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	Cigarro + Alcohol	16	4	<b>20,57</b>	<b>5,268 – 80,34</b>	<b>&lt;0,001</b>
+	Cigarro	15	8	<b>9,643</b>	<b>2,964 – 31,37</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	Cigarro	24	20	<b>6,171</b>	<b>2,160 – 16,19</b>	<b>0,001</b>
+	-	6	18	1,714	0,502 – 5,856	0,390
-	-	7	36	1	Referencia	
<b>Total</b>		79	88			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol y el modelo dominante para la variante rs20417 (-765G>C) del gen COX-2, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 19: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y COX-2 rs689466 (-1195A>G)**

P value modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,2350

Numero de observaciones :164

Homocigoto A/A	Factores de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro + Alcohol	19	1	<b>129,2</b>	<b>14,04 – 1188,64</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	Cigarro + Alcohol	8	5	<b>10,88</b>	<b>2,528 – 46,82</b>	<b>0,001</b>
+	Cigarro	24	11	<b>14,83</b>	<b>4,562 – 48,24</b>	<b>&lt;0,001</b>
-	Cigarro	15	16	<b>6,375</b>	<b>1,971 – 20,61</b>	<b>0,005</b>
+	-	8	18	3,022	0,862 – 10,60	0,084
-	-	5	34	1	Referencia	
<b>Total</b>		79	85			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol y el modelo recesivo para la variante rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 20: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y EGF rs4444903 (+61 A>G)**

P Value modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,2024

Numero de observaciones: 168

Presencia alelo A	Factores de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro + Alcohol	20	4	31,67	6,246 – 160,54	<0,001
-	Cigarro + Alcohol	7	2	22,17	3,036 – 161,84	0,002
+	Cigarro	31	18	10,91	2,830 – 42,036	0,001
-	Cigarro	8	9	5,529	1,200 – 26,41	0,028
+	-	10	37	1,712	0,421 – 6,968	0,453
-	-	3	19	1	Referencia	
<b>Total</b>		79	89			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol y el modelo recesivo para la variante rs4444903 (+61 A>G) de EGF sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 21: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

P Value modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,2108

Numero de observaciones: 171

Homocigoto G/G	Factores de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro + Alcohol	12	1	57,60	6,034 – 549,83	<0,001
-	Cigarro + Alcohol	15	5	14,40	3,056 – 58,24	<0,001
+	Cigarro	20	19	5,053	1,60 – 15,96	0,006
-	Cigarro	19	9	10,133	2,909 – 25,30	<0,001
+	-	8	34	1,129	0,328 – 3,878	0,847
-	-	5	24	1	Referencia	
<b>Total</b>		79	92			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol y el modelo recesivo para la variante rs2227983 (R521K G>A) de EGFR sobre el riesgo de cáncer de laringe.

**Tabla 22: Análisis de interacción entre el consumo de tabaco, alcohol y P53 rs1042522 (R72P G>C)**

P *value* modelo: <0,0001

Pseudo R<sup>2</sup>: 0,1988

Numero de observaciones: 161

Presencia Alelo C	Factores de riesgo	N Casos	N Controles	O.R.	Intervalo de confianza 95%	P Value
+	Cigarro + Alcohol	12	2	33,00	5,843 – 186,38	<0,001
-	Cigarro + Alcohol	15	4	20,63	5,062 – 84,03	<0,001
+	Cigarro	21	8	14,43	4,385 – 47,53	<0,001
-	Cigarro	18	20	4,950	1,684 – 14,55	0,004
+	-	7	15	2,567	0,736 – 8,955	0,139
-	-	6	33	1	Referencia	
<b>Total</b>		79	82			

Análisis de la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol y el modelo dominante para la rs1042522 (R72P G>C) de P53, sobre el riesgo de cáncer de laringe.

La presencia de la variante genética COX-2 rs20417 aumenta el riesgo de la asociación cigarro + alcohol en un 33,9% (Cigarro + Alcohol + Alelo C para COX-2 -765 O.R.: 28,28, p *value* <0,001), COX-2 rs689466 aumenta el riesgo 4,7 veces (Cigarro + Alcohol + Homocigoto A/A para COX-2 rs689466 O.R.: 129,2, p *value* <0,001), EGF rs4444903 aumenta el riesgo un 50% (Cigarro + Alcohol + Alelo A para EGF rs4444903 O.R.: 31,67, p *value* <0,001), EGFR rs2227983 aumenta el riesgo 1,72 veces (Cigarro + Alcohol + Homocigoto A/A para EGFR rs2227983 O.R.: 57,6, p *value* <0,001) y P53 rs1042522 aumenta el riesgo en un 56,3% (Cigarro + Alcohol + Alelo C para P53 rs1042522 O.R.: 33,0, p *value* <0,001).

## 11. Análisis de asociación entre variantes genéticas y sobrevida global

En la siguiente prueba se calculó el *Odds Ratio* a través de la comparación del número de fallecidos y sobrevivientes en el grupo de pacientes con cáncer de laringe y las frecuencias de las variantes genéticas analizadas, para determinar si existe alguna asociación detectable entre los SNP y la cantidad de pacientes fallecidos.

En la tabla N° 23 se presentan los resultados del análisis según genotipo, y a diferencia de los análisis de susceptibilidad para cáncer, en este caso para EGF +61 se considero el alelo G como alelo de riesgo, según la asociación con la sobrevida y el periodo libre de progresión descrita para cáncer de faringo-laringe por Su *et al.* (2014) [49]. No se observó una mejor asociación al analizar los datos según el modelo dominante o recesivo, por lo que se omitieron los datos de esos análisis.

**Tabla 23: Análisis de sobrevida global según genotipo en grupo de pacientes CL**

Genotipo	N Fallecidos	N Pacientes vivos	OR	Intervalo de confianza (95%)	P value.	Pseudo R <sup>2</sup>	P value. modelo
<b>COX-2 rs20417 (-765 G&gt;C)</b>							
G/G	1	3	Referencia			0,0196	0,3549
G/C	15	17	1,891	0,738 – 4,843	0,184		
C/C	14	30	0,714	0,068 – 7,493	0,779		
<b>COX-2 rs689466 (-1195A&gt;G)</b>							
G/G	3	8	Referencia			0,0065	0,7086
A/G	11	8	1,939	0,388 – 9,696	0,420		
A/A	31	19	1,634	0,385 – 6,930	0,505		
<b>EGF +61 A&gt;G (rs4444903)</b>							
A/A	9	13	Referencia			0,0047	0,7798
G/A	15	29	0,7471	0,2604 – 2,1435	0,588		
G/G	6	8	1,0833	0,2788 – 4,2102	0,908		
<b>EGFR R521K G&gt;A (rs2227983)</b>							
A/A	0	4	Referencia			0,0491	0,0742
G/A	11	23	<b>6708990</b>	0 – ∞	0,993		
G/G	19	23	<b>1,16e+07</b>	0 – ∞	0,993		
<b>P53 R72P G&gt;C (rs1042522)</b>							
G/G	15	26	Referencia			0,0000	0,9811
G/C	14	24	1,011111	0,405 – 2,526	0,981		
C/C	1	0	1	(datos omitidos)			

Análisis de asociación entre el número de pacientes fallecidos en el grupo de pacientes según la frecuencia de las variantes genéticas estudiadas.

## 12. Análisis de desequilibrio de ligamiento para polimorfismos del gen COX-2

Debido a que los polimorfismos estudiados del gen COX-2 se encuentran en regiones próximas del cromosoma 1, se realizó la prueba de desequilibrio de ligamiento para los polimorfismos de rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2 en el grupo de controles. El resultado presentado en la tabla N°42 (Anexo 14) refleja que no hay desequilibrio de ligamiento entre ambos SNP ya que las frecuencias de los haplotipos no difieren significativamente de las esperadas bajo equilibrio, el coeficiente de correlación R<sup>2</sup> tiende a 0 y el coeficiente de desequilibrio D1 es igual a 1.

## 13. Cálculo corregido de tamaño de muestra

Considerando las frecuencias obtenidas del polimorfismo de P53 R72P G>C se actualizó el cálculo de tamaño de muestra requerido para un estudio de caso y control en

proporción 1:1, con un nivel de confianza de 95% ( $1-\alpha$ ) y una potencia del 80%, considerando la frecuencia de controles expuestos al factor de riesgo (alelo C) de 21,07%, y la frecuencia de casos expuestos de 25,25%.

El tamaño de muestra mínimo necesario según estos datos es de 1550 individuos por rama, con un tamaño de muestra total de 3100 individuos. Si se considera la variante con menor frecuencia en voluntarios (COX-2 -765) con una proporción de controles expuestos al alelo de riesgo (Alelo C) de 16,27% y de casos expuestos de 23,74%, el número de individuos requeridos por rama disminuye a 453, y a una muestra total de 906 individuos.

Por otra parte, considerando la frecuencia del alelo de riesgo (alelo G) para la variante EGFR R521K G>A de 76,05% en individuos expuestos en el grupo de casos y 73,27% en el grupo de controles se obtiene la mayor cantidad de individuos requeridos por rama, con 3772 en cada grupo y una muestra total de 7544 individuos.

## DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la relación entre variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 y el riesgo de desarrollo de CL en una muestra de la población chilena. A partir de los datos observados se obtuvieron resultados que describen distintos tipos de asociaciones de riesgo, las cuales se discuten a continuación:

### **Factores genético-ambientales y riesgo de cáncer de laringe**

A través de los análisis realizados con los datos obtenidos se pudo determinar la relación entre cada variable y el riesgo de cáncer de laringe por medio de un modelo de regresión logística bivariado. Se confirma en este estudio que el factor que mas influye en el riesgo de desarrollo de CL es el consumo de tabaco, el cual por sí solo explica el 17,3% de la probabilidad de desarrollar cáncer de laringe según el valor de Pseudo  $R^2$ , lo cual valida la relación causal ya establecida entre este factor de riesgo y el desarrollo de cáncer de laringe. Para el consumo de alcohol en cambio la relación de riesgo observada, si bien es significativa, tiene un impacto mucho menor sobre el riesgo (Pseudo  $R^2$ : 0,028), por lo que según lo observado en este trabajo de investigación no se puede establecer una relación causal entre desarrollo de CL y consumo de alcohol, pero si se desprende del análisis estratificado realizado en la tabla N° 17 que el consumo de alcohol es capaz de incrementar de forma sinérgica el riesgo de CL, tal como había sido descrito previamente por la IARC (2012) [6].

En el análisis bivariado entre las variantes genéticas y el riesgo de CL solo se pudo establecer una relación entre los polimorfismos COX-2 rs689466 (modelo de herencia recesivo) y EGF rs4444903 (modelo de co-dominancia), sin encontrar una relación de riesgo con algún otro de los polimorfismos genéticos, aun evaluando distintos modelos de herencia. Se debe tener en cuenta que el impacto que tiene cada variante sobre el riesgo total de CL según estos modelos de regresión logística es bastante bajo, indicado por el valor de Pseudo  $R^2$  que en ningún caso es mayor a 0,053, lo que significa que el efecto de estas variantes sobre el riesgo es menor al 5,3%. Por lo tanto, con los datos obtenidos no podemos establecer una relación causal entre las variantes y el riesgo de cáncer de laringe, pese a que exista una asociación estadísticamente significativa.

En el análisis multivariado esperábamos poder determinar interacciones entre las variantes genéticas analizadas, como consecuencia de la interacción entre las cascadas de señalización que son mediadas por COX-2, EGF, EGFR y P53 y el impacto que tienen los polimorfismos genéticos sobre estas proteínas.

En primer lugar, se ha descrito que EGF puede aumentar la expresión de COX-2, y este a su vez puede transactivar a EGFR por medio de la activación del receptor de PGE<sub>2</sub>, por lo que se esperaría que ambos pudieran tener un efecto aditivo en el comportamiento de riesgo [16]. Sin embargo es lo contrario a lo que se observa en el modelo multivariado, y mientras el riesgo asociado a las variantes que afectan a la vía de señalización de EGF aumenta en este modelo, el riesgo de las variantes estudiadas para COX-2 disminuye. La interacción COX-2/EGF/EGFR hasta el momento sólo ha sido descrita en modelos *in vitro* de cáncer de colon [38], por lo que es posible que esta sinergia sea tejido específica, y que los mecanismos que median este fenómeno sean distintos a los que funcionan en el tejido epitelial de la laringe.

Por el contrario, este modelo sugiere una posible interacción entre EGF rs4444903 y P53 rs1042522 que podría aumentar la susceptibilidad de cáncer de laringe cuando se presentan las variantes de riesgo de estos dos polimorfismos, interacción que podría estar mediada por la menor capacidad de inducir apoptosis de la variante P53 72P (codificante para Prolina), la cual sumada al aumento de la actividad proliferativa mediada por EGF aumentaría la chance de transformación del tejido a una neoplasia maligna.

Por el momento y con los resultados de este estudio, no se puede confirmar ni descartar la posibilidad de sinergia entre estas variantes, y los mecanismos moleculares que mediarían esta relación deben ser determinados en modelos *in vivo* o *in vitro* que permitan observar de forma controlada esta interacción. Además se debe tener en cuenta que para la mayoría las variables consideradas en el modelo multivariado, la asociación no es estadísticamente significativa, por lo que este cambio en el comportamiento de riesgo puede no ser reproducible con un tamaño de muestra mayor.

Por otra parte el incremento del riesgo de CL asociado al consumo de tabaco en el modelo multivariado sugiere que la presencia de las variantes genéticas analizadas tienen impacto al modificar el riesgo asociado al consumo de cigarro, y no como factores de riesgo directos de cáncer de laringe, lo cual se afirma en los resultados del análisis estratificado de la interacción entre variantes genéticas y consumo de cigarro, y la

interacción entre variantes genéticas en la asociación de consumo de cigarro y alcohol. Según estos resultados, las variantes COX-2 rs20417, EGF rs4444903 y P53 rs1042522 responden al modelo de herencia genética dominante, y las variantes COX-2 rs689466 y EGFR rs2227983 responden al modelo de herencia genética recesivo como modificadores del riesgo de cáncer de laringe.

Pese a que estas interacciones son estadísticamente significativas según los modelos de regresión logística, hay que tener precaución de no sobrevalorar los resultados de estos análisis. En la mayoría de los casos los intervalos de confianza son amplios y se superponen entre ellos, por lo que esta asociación puede ser atribuible al pequeño tamaño de muestra seleccionada y no consecuencia de la interacción real entre el SNP y los factores de riesgo, por lo que se reitera la necesidad de aumentar el tamaño de muestra para validar los modelos de regresión obtenidos.

### **Análisis de sobrevida global versus SNP**

Se realizó el estudio de la mortalidad en pacientes por medio de la comparación del número de individuos fallecidos y sobrevivientes y la frecuencia de las variantes genéticas determinadas para el grupo de pacientes con cáncer de laringe.

El objetivo de esta prueba estadística es tener indicios de una posible asociación entre la agresividad del cáncer y las variantes genéticas de COX-2, P53, EGF y EGFR. Sin embargo, se debe tener en consideración que no se dispone de la información de fecha de diagnóstico ni causa de muerte para la mayoría de los pacientes, por lo que no es posible determinar datos importantes como es el tiempo de sobrevida total desde el diagnóstico, tasa de mortalidad y mortalidad atribuible al cáncer, los cuales son indicadores necesarios para un estudio formal de mortalidad.

La hipótesis de que las variantes de COX-2, EGF, EGFR y P53 pueden tener efecto en la agresividad del cáncer y la mortalidad en pacientes con cáncer de laringe nace de un conjunto de observaciones provenientes de investigaciones previas y de una extensa revisión bibliográfica. Por ejemplo se ha descrito en modelos animales que la expresión de la proteína P53 72Pro está asociada a mayor mortalidad en ratones expuestos al carcinógeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) lo cual sugiere que existe un mejor control de la evolución tumoral cuando se expresa el genotipo P53 72Arg (Sarkar *et al.* 2014), al

igual que se ha asociado esta variante a un aumento en el período libre de enfermedad en pacientes con CECyC (Azad *et al.* 2012).

Por otra parte, la mayor expresión de COX-2 se ha asociado a una mayor capacidad de migración celular en distintos tipos de líneas celulares inmortalizadas *in vitro*, y con una mayor tasa de invasividad tumoral y metástasis en cáncer de mama. Una mayor actividad de señalización mediadas por de BMP6, VEGF y Cot-T explicaría estos procesos, situando a COX-2 como un punto de convergencia entre los procesos de angiogénesis y migración celular, ambos relacionados con la agresividad del cáncer, metástasis y un peor pronóstico.

En pacientes con cáncer de mama triple negativo se ha observado una correlación positiva entre la expresión de P53 y la expresión de EGFR en el tejido neoplásico, y una mayor expresión de este receptor se relaciona con un menor grado de diferenciación y un mayor crecimiento tumoral, y por ende un peor pronóstico para estos pacientes (Wang *et al.*, 2015).

Previamente se mencionó que los genotipos homocigoto mutado para EGFR rs2227983 A/A y EGF rs4444903 G/G, se asocian a una mejor expectativa de sobrevida y periodo libre de progresión en pacientes con cáncer de faringo-laringe, genotipos que presentan menor actividad en la cascada de señalización mediada por EGF y por ende debieran asociarse a una menor capacidad para estimular la actividad proliferativa en el tumor (Fernández *et al.*, 2016).

En este caso, con los resultados obtenidos y una muestra tan reducida no se pudo determinar alguna relación entre el número de fallecidos y la frecuencia de las variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903 y P53 rs1042522 que pueda dar indicio de alguna asociación entre estas variantes y la sobrevida del paciente con cáncer de laringe. P,ara el caso de la variante EGFR rs2227983, aún cuando parece haber una mayor frecuencia de sujetos fallecidos en pacientes que portan el alelo de riesgo A, los intervalos de confianza y los valores de P para la prueba de regresión logística son demasiado altos para establecer una relación de riesgo clara, por lo que será un tema a indagar en futuras investigaciones.

## **Biología molecular del cáncer de laringe y mecanismos de carcinogénesis**

Ciclooxigenasa 2 se ha asociado en múltiples estudios experimentales con el desarrollo de cáncer en diversos tejidos. El aumento de la expresión de COX-2 ocurre en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y mitogénicos, como EGF, VEGF y  $TNF\alpha$ , y el aumento de su expresión se relaciona a la angiogénesis, hiper-proliferación, transformación e invasividad del tumor. Las variantes COX-2 rs20417 y rs689466 no producen alteración estructural en la proteína COX-2 y su participación en los procesos de transformación maligna estarían mediados por un aumento en su expresión.

El mecanismo por el cual un aumento de los niveles de COX-2 se asocia a la progresión de tejido normal a tejido neoplásico no está completamente claro, y podría estar mediado por el efecto directo de los altos niveles de prostaglandinas en los patrones de diferenciación celular, o bien por un efecto indirecto de la producción de prostaglandinas sobre el estrés oxidativo en la célula, que podría inducir daño en el ADN, acarreado cambios en el patrón de expresión de genes y modificaciones epigenéticas que podrían terminar finalmente en la carcinogénesis (Kong *et al.*, 2011).

La regulación transcripcional es el principal mecanismo de control de la expresión de COX-2, y el alelo polimórfico COX-2 rs689466 crea un sitio de unión al factor de transcripción c-MYB, observándose un aumento significativo del mRNA de COX-2 en el tejido esofágico de sujetos portadores de al menos una copia de este alelo (Zhang *et al.* 2005).

Distinto es el caso de la variante COX-2 rs20417C, la cual crea un sitio de unión para el factor de transcripción E2F pero elimina el sitio de unión para el factor de transcripción Sp1. En el mismo estudio esta variante demostró una tendencia a una mayor transcripción de mRNA de COX-2 en portadores del genotipo heterocigoto COX-2 rs20417 G/C, pero sin llegar a la significación estadística.

Es interesante observar que contrario a lo esperado, para la variante EGF rs4444903 A>G el alelo de riesgo (A) corresponde al alelo asociado con una menor expresión de EGF. Esta variante fue descrita por primera vez por Shahbazi *et al.* el año 2002 en pacientes con melanoma maligno y en voluntarios sanos de la población europea, encontrando una fuerte asociación de riesgo con el genotipo G/G (O.R.: 4,9,  $p < 0,0001$ ), mismo genotipo que se asocia a una mayor expresión de EGF. En otro estudio para cáncer gástrico se

encontró una asociación opuesta indicando al alelo A de menor expresión de EGF como alelo de riesgo. Ambos estudios se centran en tipos de cáncer que afectan a tejido epitelial con distinta especialización.

Como se mencionó anteriormente, EGF es un factor de crecimiento que activa cascadas de señalización relacionadas principalmente con actividad proliferativa, pero tal y como se ilustra en la figura 6, también puede inducir apoptosis, posiblemente mediada por la activación de P21 [18].

La sobreexpresión de EGF en modelos animales se asocia a retraso en el crecimiento y pobre desarrollo de tejido epitelial y folículos pilosos [55], por lo que es posible que para el tejido epitelial no transformado el aumento de la expresión de EGF tenga un efecto regulador del crecimiento, más que inducir actividad proliferativa descontrolada que podría asociarse al desarrollo de cáncer. Este hallazgo es opuesto a lo que se esperaba ya que la mayor expresión de EGF y de EGFR se relacionan a un peor pronóstico, menor respuesta a tratamiento y menor supervivencia en pacientes con CECyC.

El hecho de que una mayor expresión de EGF pudiera tener un efecto protector en el tejido sano de la laringe pero no en el tejido tumoral confirma la idea de que existe un cambio diferencial la respuesta de la célula epitelial a este factor de crecimiento entre el tejido sano y el tejido transformado. El mecanismo por el cual mayor expresión de EGF mediada por la variante rs4444903 A>G podría proteger contra el desarrollo de cáncer de laringe requerirá un mayor estudio de las cascadas de señalización involucradas *in vivo* y de la respuesta tejido-específica a este factor de crecimiento.

En el caso de la variante polimórfica EGFR rs2227983, se esperaba encontrar una asociación que permitiera conferirle un efecto protector del riesgo de cáncer de laringe, ya que este polimorfismo genera la sustitución del aminoácido Arginina por Leucina, haciendo al receptor menos afín a su ligando y por consecuencia, menos activo. Según los resultados observados en este trabajo de investigación, no se encuentra una asociación entre esta variante polimórfica y el riesgo de cáncer de laringe cuando se evalúa de forma aislada o en combinación con el consumo de tabaco, pero al analizar en conjunto el consumo de cigarro y de alcohol más el genotipo EGFR rs2227983, se hace evidente el incremento de riesgo producto de la combinación de estos tres factores, lo que podría indicar que esta variante se asocia a un mayor riesgo de cáncer solamente ante

una elevada exposición a carcinógenos, con un efecto despreciable en caso de que no se den tales condiciones.

Hipotéticamente, en esta situación el intenso daño al tejido derivado del consumo de cigarro y alcohol podría acarrear la sobre-estimulación de la vía de señalización de factor de crecimiento epidérmico, y la forma más activa del receptor EGFR aportaría a una mayor vulnerabilidad al presentar una mayor respuesta a su ligando y mayor efecto en la proliferación, en comparación con la variante polimórfica menos frecuente y que codifica para la forma menos activa de este receptor.

También se ha documentado una asociación entre este polimorfismo, el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad en los pacientes con cáncer de faringo-larínge portadores del genotipo homocigoto A/A [30,49].

El estudio de la frecuencia de esta variante polimórfica en la población chilena cobra gran importancia con la incorporación al arsenal farmacológico de fármacos inhibidores de EGFR como Cetuximab (Erbix®<sup>®</sup>, Merck) y Panitumumab (Vectibix®<sup>®</sup>, Tecnofarma) para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal, ya que se ha observado una menor tasa de respuesta en pacientes homocigotos silvestres para esta variante (genotipo G/G) y una mayor incidencia de reacciones adversas de tipo dermatológico comparados con los pacientes con genotipo heterocigoto u homocigoto mutado (genotipos G/A y A/A).

Aunque la información que existe hasta el momento es muy limitada, ésta debiera ser considerada en futuros estudios farmacogenéticos a nivel nacional para observar y prevenir el fallo terapéutico en pacientes candidatos a utilizar estos fármacos [15,30].

La proteína supresora de tumores P53 juega un rol crítico en la preservación de la integridad del genoma ante la presencia de factores capaces de inducir carcinogénesis, y dependiendo del tipo de daño, ésta inducirá el arresto en fase G1 o la apoptosis de la célula. La proteína variante P53 rs1042522 72Pro (alelo C) posee una mejor capacidad para interactuar con factores de transcripción TAFII32 y TAFII70 y de inducir la transcripción de genes *in vitro* comparado con la proteína P53 72Arg (alelo G), lo cual indicaría que esta forma podría ser más eficiente en cumplir con el rol transcripcional de P53 [51].

En contraste, P53 72Arg resulta ser más efectiva en frenar el ciclo de división celular e inducir la apoptosis en células transformadas *in vitro* que expresan exclusivamente esta variante *versus* las que expresan la variante P53 72Pro (Pim & Banks, 2004).

Por otra parte se ha demostrado que la presencia de la oncoproteína E6 de los serotipos de HPV-16 y HPV-18 es capaz de inducir la degradación de la forma P53 72Arg, pero no de P53 72Pro, catalizando la ubiquitinación de la proteína y su posterior degradación proteosómica, un mecanismo que permite al virus evadir el control de P53 sobre el ciclo de división celular facilitar la replicación del material genético viral [40].

Haciendo una revisión de los resultados de estudios previos, se observa que hay una tendencia para la variante P53 72Pro y un mayor riesgo de cáncer, y una tendencia para la variante P53 72Arg al riesgo de cáncer pero sólo cuando se asocia a la presencia del virus HPV, por lo que incorporar la información de la prevalencia de este virus a este estudio podría darnos una mejor comprensión de cómo la variante de P53 rs1042522 influye en el riesgo de cáncer de laringe.

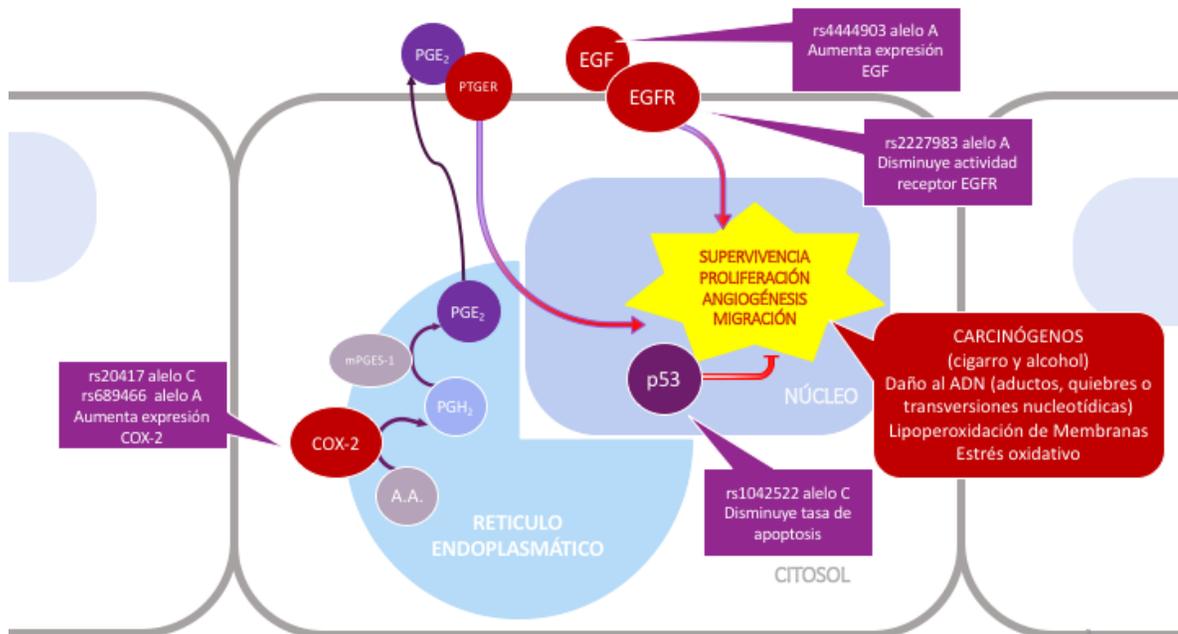
Quizás el mayor hallazgo que nace de esta investigación es el enorme impacto que tienen las variantes genéticas de COX-2, EGF, EGFR y P53 en el riesgo de CL asociado a consumo de tabaco y a la combinación de tabaco y alcohol. Como se mencionó anteriormente, el tabaco y el alcohol participan en la carcinogénesis por mecanismos que involucran la acumulación de daños en el ADN causados por sustancias reactivas que son activadas durante su metabolización por enzimas como CYP450 [17,44].

P53 es una de las principales proteínas involucradas en el control del daño causado por estos carcinógenos, induciendo el arresto en fase G1 y apoptosis de las células con daño genómico irreversible y potencial de transformación maligna, pero como bien se indicó anteriormente, la variante P53 rs1042522 72Pro no es tan eficiente en inducir la apoptosis como la forma P53 72Arg, apoptosis necesaria para la eliminación de células transformadas por carcinógenos.

En el caso de COX-2 una mayor expresión de esta proteína, y la consecuente mayor síntesis de PGE<sub>2</sub>, aportaría al desarrollo tumoral por medio de la estimulación de la angiogénesis, y tanto COX-2 como EFG/EGFR incidirían sobre el aumento de la actividad proliferativa, lo que podría desencadenar mecanismos de carcinogénesis en un intento de reparar el daño inflamatorio en el epitelio expuesto repetidamente a las sustancias

irritantes contenidas en el humo de tabaco y el alcohol, como una suerte de respuesta mal-adaptativa.

Si bien es un hecho que el cigarro y el alcohol son reconocidos agentes causales de CL y otros múltiples tipos de cáncer, solo una fracción de los individuos expuestos a estas sustancias desarrollan la enfermedad, y las variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 podrían aportar una parte de la explicación de por qué algunas personas son más susceptibles que otras al desarrollo de CL [19].



**Figura 9:** Esquema corregido de las interacciones observadas entre COX-2 EGF, EGFR y P53, la contribución que tienen en el proceso de transformación maligna en cáncer de laringe y el efecto en la proteína de cada una de las variantes genéticas estudiadas. Este modelo representa una célula de tejido epitelial marcado por el rectángulo en gris. Las flechas de color rojo señalan las vías de señalización que contribuyen directamente al desarrollo de cáncer, los cuadros violeta representan el efecto que tiene cada variante sobre la proteína codificada por el gen al que afectan, y el cuadro rojo representa el efecto de los carcinógenos contenidos en el humo de tabaco y en el alcohol en el riesgo de cáncer de laringe, que es potenciado por la influencia de las variantes genéticas descritas en la figura [5,6,10,12,16,17,18,22,38,44,47,49,50,53].

En la figura 9 se describe de forma corregida el esquema presentado previamente en la figura 8, explicando de forma simplificada los mecanismos por los cuales COX-2, EGF, EGFR y P53 podrían modificar la biología molecular de la célula del epitelio de la laringe, conduciendo al proceso de transformación maligna, incluyendo en el esquema el efecto de los carcinógenos contenidos en el cigarro y alcohol y el efecto de las variantes

polimórficas de interés, a modo de ilustrar de forma sencilla la interacción observada en este estudio entre todas estas variables.

Se descartan del esquema las interacciones sinérgicas entre los mediadores moleculares descritos en la figura 8, ya que los resultados observados no dan indicios de que tales interacciones estén presentes en el desarrollo de cáncer en el tejido epitelial de la laringe.

### **Limitaciones del trabajo de investigación**

Sin perjuicio que este trabajo obtuvo interesantes resultados de asociación genético-ambientales en cáncer de laringe, en un análisis *a posteriori* del tamaño de muestra, se determinó que el número de individuos enrolados no alcanzó a ser suficiente para establecer algunas asociaciones, considerando las frecuencias obtenidas para las variantes COX-2 rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983, P53 rs1042522 en la muestra de la población chilena analizada.

Un detalle importante que apunta a que el tamaño de muestra no es el óptimo es que la variable sexo masculino parece comportarse como un factor protector de riesgo en los modelos de regresión logística presentados, siendo que por literatura y en base a previos estudios epidemiológicos se ha determinado que existe una fuerte asociación entre el sexo masculino y el riesgo de cáncer de laringe.

Este resultado puede atribuirse al bajo número de mujeres en el grupo de voluntarios comparado con el grupo de pacientes con cáncer de laringe (2,9% vs. 10,1%) por lo que a futuro debe considerarse el aumento de tamaño de muestra para validar los resultados presentados y obtener un modelo de regresión logística que represente mejor el impacto de estos genotipos en el riesgo de cáncer y la interacción gen-ambiente.

La diferencia en la prevalencia de factores de riesgo causales de cáncer de laringe también es un aspecto importante a considerar, aunque el seleccionar a individuos con hábitos de consumo de tabaco y alcohol similares al grupo de pacientes CL podría significar un sesgo en la selección del grupo de control para este estudio, al excluir a una gran parte de individuos representativos de la población general que no son fumadores y no consumen alcohol.

La solución a este problema sería reclutar una mayor cantidad de voluntarios de sexo femenino para que la distribución de género sea similar entre ambos grupos, y que tal como se hizo hasta ahora, estos voluntarios cumplan con el criterio de edad sobre los 65 años, de manera tal que se evite incluir a voluntarios que puedan desarrollar el evento a investigar (cáncer de laringe) en el futuro.

Los hallazgos más importantes de esta investigación provienen del análisis de regresión logística estratificado considerando los datos de consumo de cigarro, alcohol y las variantes genéticas de interés. Estos modelos de regresión logística permiten observar de forma clara el efecto de las variables de interés por separado y el efecto de la coacción entre ellas, por lo que son una herramienta útil para evaluar la interacción entre los factores de riesgo ambientales y genéticos, pero pueden llevar a modelos de regresión sobre-ajustados que no representen la interacción real entre las variables analizadas.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que tal como se mencionó previamente, el consumo de tabaco y alcohol tienen un efecto dosis dependiente en el riesgo de cáncer de laringe, el cual se incrementa de forma exponencial con el aumento del consumo de cualquiera de estos dos carcinógenos.

Establecer el índice tabáquico como criterio para definir a un sujeto fumador permite establecer un punto de corte que diferencia una exposición de mayor riesgo al humo de cigarro de una exposición menor y despreciable, pero ya que esta información sigue siendo analizada como una variable dicotómica y no como una variable continua, el procesamiento de los datos por regresión logística oculta el efecto dosis dependiente que el consumo de cigarro y alcohol tienen sobre la probabilidad de desarrollo de cáncer de laringe en la población estudiada, por lo que el efecto de las variantes genéticas puede estar sobrevalorado al no considerar esta información dentro de los modelos de regresión.

Por último, se necesitan datos completos y hacer seguimiento a una mayor cantidad de pacientes para establecer la relación entre los SNP y mortalidad, especialmente tomando en cuenta que la tendencia de aumento del número de fallecidos en el grupo de pacientes asociado a la variante EGFR rs2227983 no puede ser evaluada debido al bajo número de sujetos considerados en este análisis.

## CONCLUSIONES

- Las frecuencias genóticas para las variantes estudiadas son: G/G= 0,690, G/C= 0,294, C/C= 0,016 para COX-2 rs20417 (-765G>C); A/A = 0,397, A/G= 0,500, G/G= 0,103 para COX-2 rs689466 (-1195A>G); G/G= 0,336, G/A= 0,508, A/A= 0,156 para EGF rs4444903 (+61 A>G); G/G= 0,590, G/A= 0,336, A/A= 0,074 para EGFR rs2227983 (R521K G>A) y G/G= 0,628, G/C= 0,322, C/C= 0,050 para P53 rs1042522 (R72P G>C) en la muestra población general.
- Se observa una relación de riesgo marginal de CL con el genotipo homocigoto de riesgo A/A (modelo recesivo) para COX-2 rs689466 (O.R.: 2,48, p *value*: 0,001), el genotipo A/A de EGF rs4444903 (O.R.: 2,44, p *value*: 0,025, modelo de co-dominancia), y una asociación de protección para el genotipo A/G de COX-2 rs689466 (O.R.: 0,354 p *value*: 0,022, modelo de co-dominancia).
- Se observa una posible sinergia en el riesgo de CL entre el consumo de tabaco y las variantes P53 rs1042522 y EGF rs4444903, analizándolas en conjunto con las variables sexo, consumo de alcohol, COX-2 rs20417, COX-2 rs689466 y EGFR rs2227983.
- Se observa un importante incremento del riesgo asociado al consumo de tabaco en combinación con el modelo de herencia dominante de COX-2 rs20417 (0,346 veces), de EGF rs4444903 (0,604 veces) y de P53 rs1042522 (0,51 veces) y el modelo recesivo de COX-2 rs689466 (1,465 veces).
- Se observa un importante incremento del riesgo asociado al consumo de tabaco junto con alcohol, en combinación con el modelo de herencia dominante de COX-2 rs20417 (0,339 veces), de EGF rs4444903 (0,5 veces) de P53 rs1042522 (0,56 veces) y el modelo recesivo de EGFR rs2227983 (1,72 veces) y de COX-2 rs689466 (4,7 veces).
- No se observa asociación entre las variantes genéticas de COX-2 rs20417 y COX-2 rs689466, P53 rs1042522, EGF rs4444903 y EGFR rs2227983 y la frecuencia de fallecidos en el grupo de pacientes con cáncer de laringe.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Alqumber MAA, Akhter N, Haque S, Panda AK, Mandal RK (2014) Evaluating the Association between P53 Codon 72 Arg>Pro Polymorphism and Risk of Ovary Cancer: A Meta-Analysis. PLoS ONE, 9(4), e94874. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094874>.
- (2) American Cancer Society (2017) About Laryngeal and Hypopharyngeal Cancers. USA. American Cancer Society. Recuperado de <http://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8664.00.pdf>
- (3) Araújo A, Costa B, Pinto-Correia A, Fragoso M, Ferreira P, Dinis-Ribeiro M, Costa S, Reis R, Medeiros R (2011). Association between EGF +61A/G polymorphism and gastric cancer in Caucasians. *World Journal of Gastroenterology* 17(4):488–492
- (4) Azad A, Bairati I, Samson E, Cheng D, Mirshams M, Qiu X, Savas S, Waldron J, Wang C, Goldstein D, Xu W, Meyer F & Liu G (2012) Validation of Genetic Sequence Variants as Prognostic Factors in Early-Stage Head and Neck Squamous Cell Cancer Survival. *Clinical Cancer Research* 18(1):196–206. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1759>.
- (5) Bakhle YS (2001) COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *British Journal of Pharmacology* 134(6):1137–1150.
- (6) Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Ed.) (2005) Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* (pp.108-162) Lyon, France: IARC Press.
- (7) Bell E, Ponthan F, Whitworth C, Tweddle DA, Lunec J, Redfern CP(2014) COX2 expression in neuroblastoma increases tumorigenicity but does not affect cell death in response to the COX2 inhibitor celecoxib. *Clin Exp Metastasis* 31:651–659. doi:10.1007/s10585-014-9656-3
- (8) Bonelli P, Tuccillo FM, Calemma R, Pezzetti F, Borrelli A, Martinelli R, De Rosa A, Esposito D, Palaia R, Castello G (2011) Changes in the gene expression profile of gastric, cancer cells in response to ibuprofen: a gene pathway analysis. *The Pharmacogenomics Journal* 11:412–428.
- (9) Brikman GL, Coates O (1963) The effect of bronchitis, smoking and occupation in ventilation. *American Review of Respiratory Disease* 87:68–93

- (10) Campanholo VMLP, Felipe AV, Lima JM, Pimenta CAM, Ventura RM, Forones NM (2014) -765 G>C Polymorphism of the COX-2 gene and gastric cancer risk in Brazilian population. *Archives of Gastroenterology* 51(2):79–83.
- (11) Cardemil F (2014) Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Revista Chilena de Cirugía* 66(6):614–620.
- (12) Cattelani S, Ferrari-Amorotti G, Galavotti S, Defferrari R, Tanno B, Cialfi S, Calabretta B (2012) The P53 Codon 72 Pro/Pro Genotype Identifies Poor-Prognosis Neuroblastoma Patients: Correlation with Reduced Apoptosis and Enhanced Senescence by the P53-72P Isoform. *Neoplasia NY* 14(7):634–643.
- (13) Chen X, Sturgis EM, El-Naggar AK, Wei Q, Li G (2008) Combined effects of the P53 codon 72 and p73 G4C14-to-A4T14 polymorphisms on the risk of HPV16-associated oral cancer in never-smokers. *Carcinogenesis* 29(11):2120–2125. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgn191>
- (14) de la Calle-Martin O, Fabregat V, Romero M, Soler J, Vives J, Yague J (1990) AccII polymorphism of the P53 gene. *Nucleic Acids Research* 18:4693
- (15) Fernández-Mateos J, Seijas-Tamayo R, Mesía R, Taberna M, Pastor Borgoñón M, Pérez-Ruiz E, Adansa Klain JC, Vázquez Fernández S, Del Barco Morillo E, Lozano A, González Sarmiento R, Cruz-Hernández JJ (2016) Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway polymorphisms as predictive markers of cetuximab toxicity in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in a Spanish population. *Oral Oncology* 63:38–43.
- (16) Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A (2003) Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?. *The Lancet Oncology* 4(10):605–615. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01220-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01220-8)
- (17) Hecht S (1999) Tobacco smoke carcinogens lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91(14):1194–1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>
- (18) Högnason T, Chatterjee S, Vartanian T, Ratan RR, Ernewein KM, AHabib, A (2001) Epidermal growth factor receptor induced apoptosis: potentiation by inhibition of Ras signaling. *FEBS Letters* 491(1):9–15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02166-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02166-4)
- (19) International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012) Tobacco Smoking. En *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon, France:43 – 163

- (20) International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. Recuperado de: <http://globocan.iarc.fr>
- (21) Irrarrázabal C, Rojas C, Orellana C, Acevedo C, Huidobro C, Cáceres D, Varela N, Quiñones L (2006) Joint effect among P53, CYP1A1, GSTM1 polymorphism combinations and smoking on prostate cancer risk: an exploratory genotype-environment interaction study. *Asian Journal of Andrology* 8(3):349–355.
- (22) Joerger AC, Fersht AR (2010) The Tumor Suppressor P53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(6):a000919. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>
- (23) Kong J, Crissey MAS, Stairs DB, Sepulveda AR, & Lynch JP (2011) Cox2 and  $\beta$ -Catenin/T-cell Factor Signaling Intestinalize Human Esophageal Keratinocytes When Cultured under Organotypic Conditions. *Neoplasia* NY 13(9):792–805.
- (24) Levendoski EE, Leydon C, Thibeault SL (2014) Vocal Fold Epithelial Barrier in Health and Injury a Research Review. *J Speech Lang Hear Res* 57(5):1679–1691. [http://doi.org/10.1044/2014\\_JSLHR-S-13-0283](http://doi.org/10.1044/2014_JSLHR-S-13-0283)
- (25) Liu X, Fan Q, Ni L, Liu F, Huang S, Gao J, Chen B (2015) GSTM1 null genotype is a risk factor for laryngeal cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8(5):7661–7666.
- (26) López-Cortés A, Guerrero S, Redal MA, Alvarado AT, Quiñones L (2017) State of Art of Cancer Pharmacogenomics in Latin American Populations. *International Journal of Molecular Sciences* 18(6):639. <http://doi.org/10.3390/ijms18060639>
- (27) Masood N, Yasmin A, Kayani, MA (2013) Genetic Deletions of GSTM1 and GSTT1 in Head and Neck Cancer: Review of the Literature from 2000 to 2012. *Asian Pacific Journal of Cancer prevention* 14(6):3535–3559.
- (28) Masood N, Yasmin A, Kayani MA (2014) Genetic variations and head and neck cancer risks. *Molecular Biology Reports* 41(4):2667–2670
- (29) Maurya SS, Anand G, Dhawan A, Khan AJ, Jain SK, Pant MC, Parmar D (2014) Polymorphisms in Drug-Metabolizing Enzymes and Risk to Head and Neck Cancer: Evidence for Gene-Gene and Gene-Environment Interaction. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 55(2):134-144.
- (30) Mustafa OH, Hamzeh AR, Ghabreau L, Akil N, Almoustafa AE, Alachkar A (2013) Allele Frequencies of the Epidermal Growth Factor Receptors Polymorphism R521K in Colorectal Cancer Patients and Healthy Subjects Indicate a Risk-Reducing Effect of K521 in Syrian Population. *North American Journal of Medical Sciences* 5(3):202-206.

- (31) Nazar G, Cabezas L (2003) Cáncer de Laringe. Revista Médica Clínica Las Condes. 14(2) Recuperado de [http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/MED\\_14\\_3/CancerLaringe.pdf](http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/MED_14_3/CancerLaringe.pdf)
- (32) NCBI National Institutes of Health. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1042522 dbSNP Short Genetic Variations. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1042522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1042522)
- (33) NCBI National Institutes of Health. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs20417 dbSNP Short Genetic Variations. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=20417](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=20417)
- (34) NCBI National Institutes of Health. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2227983 dbSNP Short Genetic Variations. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2227983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2227983)
- (35) NCBI National Institutes of Health. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4444903 dbSNP Short Genetic Variations. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=4444903Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4444903Z)
- (36) NCBI National Institutes of Health. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs689466 dbSNP Short Genetic Variations. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=689466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=689466)
- (37) NIH U.S: National Library of Medicine (2017) TP53 gene. Genetics Home Reference. Recuperado de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
- (38) Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF-receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. Nature Medicine 8:289–93. <http://doi.org/10.1038/nm0302-289>
- (39) Pichón A, Bardach A, Caporale J, Alcaraz A, Augustovski F, Caccavo F, Vallejos V, Velazquez Z, De La Puente C, Bustos L, Castillo M, Castillo C (2014) Carga de Enfermedad atribuible al Tabaquismo en Chile. Documento Técnico IECS N° 8. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria BA Argentina.
- (40) Pim D, Banks L (2004) P53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. Int. J. Cancer 108:196–199.
- (41) Rosen CA, Simpson B (2008) Anatomy and Physiology of the Larynx. Operative Techniques in Laryngology. Springer Science & Business Media:3–8.
- (42) Russell JS, Colevas AD (2012) The Use of Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.

- (43) Sarkar J, Dominguez E, Li G, Kusewitt DF, Johnson DG (2014) Modeling Gene-Environment Interactions in Oral Cavity and Esophageal Cancers Demonstrates a Role for the P53 R72P Polymorphism in Modulating Susceptibility. *Molecular Carcinogenesis* 53(8):648–658. <http://doi.org/10.1002/mc.22019>
- (44) Seitz H, Stickel F (2007) Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7:599–612.
- (45) Senthilkumar KP, Thirumurugan R (2014) Risk modulation of GSTM1–GSTT1 interactions to head and neck cancer in tobacco users. *Molecular Biology Reports* 41(9):5635–5644.
- (46) Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC, Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Hutchinson IV(2002) Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *The Lancet*, 359(9304):397–401. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07600-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07600-6)
- (47) Shin WG, Kim HJ, Cho SJ, Kim HS, Kim KG, Jang MK, Kim HY (2012) The COX-2-1195AA Genotype Is Associated with Diffuse-Type Gastric Cancer in Korea. *Gut and Liver* 6(3):321–327.
- (48) Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998) Role of a P53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature* 393:229–234.
- (49) Su NW, Leu YS, Lee JC, Liu CJ, Cheng CY, Lin JS, Chang YF (2014) EGF and EGFR genetic polymorphisms predict prognosis in locally advanced pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma patients receiving postoperative concurrent chemoradiotherapy. *OncoTargets and Therapy* 7:2197–2204.
- (50) The GeneCards human gene database. EGFR Gene (Protein Coding) Epidermal Growth Factor Receptor. Recuperado de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR>
- (51) Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999) Two Polymorphic Variants of Wild-Type P53 Differ Biochemically and Biologically. *Molecular and Cellular Biology* 19(2):1092–1100.
- (52) Uniprot Consortium (2017) UniProtKB P04637 (P53\_HUMAN) The Universal Protein Resource (Uniprot). Recuperado de <http://www.uniprot.org/uniprot/P04637>

- (53) Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B (2009) Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma. *Mutation Research* 663:52–59. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.007
- (54) Wang WZ, Liu Q, Sun JJ, Zuo WS, Hu DW, Ma SG, Mu DV, Yu ZY (2015) Correlation between P53 and epidermal growth factor receptor expression in breast. *Genetic and Molecular Research* 14(2):4282-4290. doi: 10.4238/2015.April.28.10
- (55) Zeng F, Harris RC (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 0:2–11. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.011>
- (56) Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X, Shen Y, Qiang B, Kadlubar FF, Lin D (2005) Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association with Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology* 129(2):565–576.
- (57) Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhu B, Zhu Y, Chen Z (2009) Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 and laryngeal cancer risk: evidence-based meta-analyses. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 135(8):1081-1090. <http://doi.org/10.1007/s00432-009-0548-x>.

## ANEXOS

### Anexo 1: Resumen de proyecto de Investigación

**TITULO:**

Polimorfismos genéticos de p53 y Cox-2 como marcadores de riesgo de cáncer de laringe

**Tamara Barría, Maritza Rahal, Luis Quiñones, María José Herrera, Miguel Cancino, Carla Miranda.**

Servicio Otorrinolaringología Hospital Barros Luco Trudeau  
Laboratorio CQF, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**RESUMEN DEL PROYECTO Y DURACION.**

*Introducción:* El cáncer de laringe corresponde a una entidad oncológica importante en cabeza y cuello, describiéndose según la serie de proporciones entre 25 – 40% de las neoplasias malignas de cabeza y cuello. Respecto a su patogénesis, se han planteado varios factores predisponentes, dentro de los cuales se encuentran el tabaquismo, el consumo de alcohol, el virus papiloma humano (VPH), entre otros. Por otra parte, se ha involucrado el desarrollo de la biología molecular en el estudio de la carcinogénesis, donde se han vinculado fuertemente al proceso carcinogénico al gen supresor de tumor p53 (TP53) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), existiendo una interacción entre ambas la cual no ha podido ser aclarada totalmente. Se ha planteado que las mutaciones de p53 en la región del codón 72 y alteraciones en la función de COX-2 basada en polimorfismos de su región promotora (1195A/G y 765G/C), podrían jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de cabeza y cuello (CECC), pero existe escasa información respecto a dichos polimorfismos en cáncer laríngeo e importante variabilidad según población evaluada.

*Objetivo:* Determinar potenciales asociaciones entre la presencia de polimorfismos en el codón 72 del gen p53 y la enzima COX-2, y el desarrollo del carcinoma escamoso primario de laringe y su evolución clínico-patológica.

Este trabajo se desarrollará como proyecto de tesis para la especialidad de otorrinolaringología del investigador responsable.

*Metodología:* Se realizará un estudio caso-control, analizando muestras de sangre periférica de pacientes con carcinoma escamoso de laringe y pacientes sanos, realizándose la genotipificación para p53 codón 72 y para los polimorfismos -1195A/G y -765G/C de Cox-2, mediante una amplificación por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), y mediante ensayo de discriminación de dos colores en un termociclador de tiempo real. De esta manera, se espera identificar una predisposición de estos polimorfismos para desarrollar un carcinoma escamoso de laringe.

*Resultados Esperados:* Se espera encontrar asociaciones entre los polimorfismos de p53 y COX-2, y el desarrollo de cáncer escamoso de laringe, que pudiera hacerlos considerarlos como marcadores de riesgo.

## Anexo 2: Consentimiento Informado

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### Estimado Señor(a):

Me dirijo a usted con el propósito de solicitar su colaboración para la realización de un estudio acerca del efecto de la genética en el cáncer de laringe. El estudio se denomina: ***“Caracterización clínico-patológica del cáncer espinocelular primario de laringe y su correlación con los niveles de p53 y COX-2 intratumorales”***.

Este trabajo de investigación será realizado analizando las biopsias con las cuales se le realizó el diagnóstico de cáncer de laringe y con datos de relevancia médica extraídos de su ficha clínica y/o aportados por usted a través de una entrevista personal. Participar de este estudio no involucra ningún costo monetario para usted.

Este estudio tiene por objetivo obtener información valiosa que permita aportar en el conocimiento del cáncer de laringe. Los resultados de esta investigación pueden ser publicados, sin embargo su identidad no será revelada y sus datos clínicos permanecerán en forma confidencial.

Esta investigación se llevará a cabo gracias a la colaboración del Complejo Asistencial Barros Luco y el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética del Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Como parte del estudio usted deberá llenar una ficha clínica que incluye datos de identificación personal e historia médica. Tanto la información de la ficha, como los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales y los puede conocer en cuanto se encuentren disponibles solicitándolos directamente al Investigador Principal: Dr. Miguel Ángel Cancino Castañeda, teléfono fijo: +56 2 2576 3359, teléfono móvil: +56 9 9917 0349, correo electrónico: m.a.cancino.c@gmail.com.

Si usted considera inadecuado el estudio tiene el derecho de rechazarlo, sin que esto vaya en desmedro de la atención que usted requiere. De la misma forma usted podrá retirarse de este estudio en cualquier momento sin ser obligado(a) a dar razones sin que esto lo(a) perjudique en la calidad de paciente o usuario(a).

Si usted tiene cualquier pregunta acerca del proceso de obtención del consentimiento informado o sus derechos como sujeto de estudio, entonces usted puede contactar, en cualquier momento, a la Presidenta del Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur: Q. F. Sra. Verónica Rivera Sciaraffia, dirección: Avenida Santa Rosa N° 3453, comuna de San Miguel, Santiago, Chile, teléfono: +56 2 2576 3850, celular institucional: +56 9 5858 2831, correo electrónico: verónica.rivera@redsalud.gob.cl

Declaro conocer los términos del estudio aquí señalado y consiento voluntariamente la utilización de las biopsias tumorales y de la información médica extraída de mi ficha clínica y/o aportada por mí.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_  
RUT: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_ N°Ficha: \_\_\_\_\_ Telefono: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del representante: \_\_\_\_\_  
RUT: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_

Investigador que aplica consentimiento: \_\_\_\_\_  
RUT: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del Ministro de Fe: \_\_\_\_\_  
RUT: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_

Gracias por su colaboración

**Anexo 3: Ficha clínica para pacientes con cáncer de laringe**

FICHA CLÍNICA DE CASOS			
GRUPO SANG:	<input type="text"/>	Nº FICHA: <input type="text"/>	
<b>I.- IDENTIFICACIÓN:</b>			
FECHA MUESTRA Y BIOPSIA:	<input type="text"/>	DAD: <input type="text"/>	
<input type="text"/>			
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
<input type="text"/>			
DIRECCION	COMUNA	TELEFONO	
<b>II.- ANTECEDENTES FAMILIARES:</b>			
Abuelo con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>
Padre con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>
Hermanos con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>
Otros Familiar con Ca Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>
Familiar con otro tipo de Cáncer:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>
<b>III.- EXPOSICIÓN A AGENTES TÓXICOS:</b>			
Cigarrillo	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/> Cigarrillos/día	<input type="text"/> Tiempo
Alcohol	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/> Copas/día	<input type="text"/> Copas/f. de semana
	<input type="text"/> Tiempo		
<b>IV.- ANTECEDENTES CLINICOS:</b>			
Diagnóstico Oncológico:		Cirugía:	
Estadio:		Disección de cuello:	
Biopsia:		Rö:	
		QT:	
<b>VI.- OBSERVACIONES (trabajo, comorbilidades, medicamentos, Etnia, etc.):</b>			

**Anexo 4: Ficha clínica para voluntarios sin diagnóstico de cáncer**

<b><u>FICHA CLÍNICA DE CONTROLES</u></b>		
GRUPO SANG:	<input style="width: 60%;" type="text"/>	Nº FICHA: <input style="width: 60%;" type="text"/>
<b>I.- IDENTIFICACIÓN:</b>		
FECHA MUESTRA Y BIOPSIA:	<input style="width: 60%;" type="text"/>	RUT.: <input style="width: 60%;" type="text"/> EDAD: <input style="width: 60%;" type="text"/>
<input style="width: 100%;" type="text"/>		
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES
<input style="width: 100%;" type="text"/>		
DIRECCION	COMUNA	TELEFONO
<input style="width: 100%;" type="text"/>		
<b>II.- ANTECEDENTES FAMILIARES:</b>		
Abuelo con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/>
Padre con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/>
Hermanos con Cáncer Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/>
Otros Familiar con Ca Laringe:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/>
Familiar con otro tipo de Cáncer:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/>
<b>III.- EXPOSICIÓN A AGENTES TÓXICOS:</b>		
Cigarrillo	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input style="width: 60%;" type="text"/>	Cigarrillos/día <input style="width: 60%;" type="text"/> Tiempo
Alcohol	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input style="width: 60%;" type="text"/>	Copas/día <input style="width: 60%;" type="text"/> Copas/f. de semana
	<input style="width: 60%;" type="text"/>	Tiempo
<b>IV.- OBSERVACIONES (trabajo, comorbilidades, medicamentos, Etnia, etc.):</b>		
<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>		

## Anexo 5: Resolución Exenta N° 4352, aprueba el proyecto de investigación



DIRECCION  
UNIDAD PROYECTOS  
Y ESTUDIOS ASISTENCIALES



RESOLUCIÓN EXENTA N° 4352

SANTIAGO,

28 MAY 2015

VISTOS:

El art. 15° transitorio de la Ley N° 19.937; las facultades otorgadas por los artículos 35 y 36 del DFL N° 1, de 2005, del Ministerio de Salud, que fijó el texto refundido, coordinado y sistematizado del Decreto Ley N° 2.763, de 1979 y de las Leyes N° 18.933 y N° 18.469; el art. 43 inciso segundo del D.S. N° 140 de 2005, Reglamento Orgánico de los Servicios de Salud; los artículos 22 y 23 del Decreto de Salud N° 38, de 2005, que aprobó el Reglamento Orgánico de los Establecimientos de Salud de Menor Complejidad y de los Establecimientos de Autogestión en Red y sus modificaciones; la Ley N° 20.594, sobre Derechos y deberes de las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud; Resolución N° 85, de 09 de mayo de 2013, del Servicio de Salud Metropolitano Sur, tomada de razón por Contraloría General de la República 31 de enero de 2014, sobre nombramiento en el cargo de Director del Hospital Barros Luco Trudeau; la Resolución N° 1600, de 2008, de Contraloría General de la República, que fija normas sobre exención del trámite de toma de razón; y

CONSIDERANDO

Que el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Sur ha dado autorización al proyecto de investigación denominado "Caracterización clínico-patológica del cáncer espinocelular primario de laringe y su correlación con los niveles de p53 y COX -2 intratumorales", según da cuenta el Memo N° 07/2015 de ese Comité; Que esta investigación será desarrollada por el Investigador Dr. Miguel Cancino Castañeda; Que vista la solicitud del Jefe de la Unidad de Estudios Asistenciales en orden a dar aprobación formal al convenio de investigación suscrito entre el profesional y este establecimiento, dicto la siguiente;

RESOLUCION

1.- APRUEBASE el convenio para la ejecución del proyecto de investigación denominado "Caracterización clínico-patológica del cáncer espinocelular primario de laringe y su correlación con los niveles de p53 y COX -2 intratumorales", suscrito el 28 de abril de 2015, que es del siguiente tenor:

### CONVENIO DE INVESTIGACION

"Caracterización clínico-patológica del cáncer espinocelular primario de laringe y su correlación con los niveles de p53 y COX -2 intratumorales"

En San Miguel, a 28 de abril de 2015, entre el HOSPITAL BARROS LUCO TRUDEAU, Hospital autogestionado en red, representado por su Director Dr. LUIS LEIVA PEÑA, cédula de identidad N° 6.765.914 -7, en adelante "el Hospital", ambos domiciliados para estos efectos en Gran Avenida J. Miguel Carrera N° 3204, San Miguel; y por otra parte, D. MIGUEL CANCINO CASTAÑEDA, cédula nacional de identidad N° 15.485.380-4, médico residente del programa de especialización en Otorrinolaringología de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, institución con convenio asistencial docente vigente, domiciliado en Los Helechos N° 889, Ñuñoa, en adelante el "Investigador", han celebrado el siguiente convenio:

PRIMERO: El Investigador cuenta con la autorización del Comité Ético Científico, según consta de Memo N° 07 de 03 de febrero de 2015, para el desarrollo del Protocolo de Investigación denominado "Caracterización clínico-patológica del cáncer espinocelular primario de laringe y su correlación con los niveles de p53 y COX -2 intratumorales".

Conforme a esta aprobación, el Director del Hospital Barros Luco Trudeau autoriza al investigador para que



enrole a pacientes institucionales, que acuden al Hospital o al Centro de Diagnóstico y Tratamiento, para que participen en el estudio que busca determinar la asociación entre la expresión de los polimorfismos genéticos de p53 y Cox-2 y la sobrevida de pacientes con cáncer laríngeo.

Esta autorización procede siempre que los pacientes hayan sido previamente informados acerca del Protocolo y objetivos de la investigación, y hayan firmado libremente el consentimiento informado aprobado para este efecto.

El enrolamiento de pacientes para el Protocolo comenzará una vez que se dé aprobación a este convenio y su vigencia es hasta el 31 de diciembre de 2016.

**SEGUNDO:** El Investigador se compromete a observar las normas de procedimientos, reglamentarias y legales que rigen tanto a los estudios de investigación con ensayos clínicos, como aquellos que rigen a los Servicios de Salud y a los Establecimientos de la Red Asistencial.

**TERCERO:** El Investigador debe cumplir su cometido de acuerdo a lo comprometido en el Protocolo y la respectiva carta Gantt y deberá informar del resultado final de la investigación a la Unidad de Proyectos y Estudios Asistenciales.

El investigador se obliga a mencionar la colaboración del Hospital Barros Luco Trudeau, cada vez que se presenten los resultados de la investigación en instancias de difusión científica.

Asimismo, el Investigador autoriza al Hospital para usar los resultados de la investigación en cuanto contribuyan a la actividad clínica o a la gestión que realiza el Hospital.

**CUARTO:** El investigador se obliga a guardar estricta confidencialidad acerca de la información recopilada de carácter sensible y de naturaleza individual de las personas que participan del proyecto de investigación. En caso de incumplimiento de esta obligación el Hospital iniciará las acciones administrativas y judiciales que correspondan para la reparación de los perjuicios causados, y se pondrá término a este convenio.

**QUINTO:** El Investigador, o miembros del equipo de investigación, que tengan la calidad de funcionarios del Hospital, deberán desarrollar la investigación fuera de su jornada contratada en el Hospital, no pudiendo en modo alguno postergar o menoscabar el cumplimiento de las funciones.

En el evento de requerirse el uso de fracción de tiempo de horario funcionario para alguna de las actividades relacionadas con los pacientes, el tiempo empleado se completará al término de la respectiva jornada laboral.

**SEXTO:** Las actividades de invitación a participar en el protocolo, se realizarán en horario funcionario y no significarán incumplimiento a las limitaciones de la cláusula anterior.

**SÉPTIMO:** El Hospital podrá poner término al convenio, en caso de incumplimiento de las obligaciones que asume el Investigador, por lo cual notificará al Investigador de tal decisión, y cesará en consecuencia la autorización para continuar con la investigación.

**OCTAVO:** El Hospital, a través de la Unidad de Proyectos y Estudios Asistenciales velará por el correcto cumplimiento de este convenio, por lo que podrá pedir estados de avance, supervisar el cumplimiento de las normas e instrucciones del Hospital, recibir el Informe Final, informar acerca de su cumplimiento por parte del Investigador, coordinar las solicitudes que se realicen, entre otras actividades.

**NOVENO:** Para efectos de la firma del consentimiento informado actuará como Ministro de Fe don Juan Pereira Morales, cedula de identidad N°9.498.792-K, enfermero de la Placa Técnica del Hospital y sin ninguna vinculación con el presente Protocolo de Investigación, quien deberá recibir inducción de su función y supervisión por parte de la Unidad de Proyectos y Estudios Asistenciales.

**DECIMO:** El Investigador se compromete a enviar copia de todos los consentimientos informados a la Unidad de Proyectos y Estudios Asistenciales, así como informar acerca de los pacientes enrolados y la etapa de avance en el estudio, terminado o no.

**DECIMO PRIMERO:** Forma parte de este convenio, y no se insertan por ser conocidos de las partes, los siguientes documentos:

- Aprobación del protocolo por parte del Comité Ético Científico del SSMS.
- Protocolo de Investigación.
- Curriculum del Investigador.



DECIMO SEGUNDO: Este convenio se extiende en dos ejemplares, de idéntico tenor y fecha, quedando un ejemplar en poder de cada parte.

DECIMO TERCERO: La personería de don Luis Leiva Peña para representar al Hospital, consta en la Resolución N° 85, de 09 de mayo de 2013, del Servicio de Salud Metropolitano Sur, tomada de razón por Contraloría General de la República 31 de enero de 2014.

Hay firmas del Dr. Miguel Cancino Castañeda, Investigador y del Dr. Luis Leiva Peña, Director del Hospital Barros Luco Trudeau.

2.- La ejecución de este estudio deberá realizarse con estricta sujeción a las normas establecidas en el convenio respectivo.

3.- Corresponderá a la Unidad de Estudios Asistenciales vigilar el cumplimiento de las condiciones establecidas en el convenio.

4.- PUBLIQUESE esta Resolución de acuerdo a lo previsto en el artículo 7° de la Ley N° 20.285 sobre Acceso a la Información Pública y en el artículo 51 de su Reglamento.

ANOTESE Y COMUNIQUESE



DR. LUIS LEIVA PEÑA  
DIRECTOR  
HOSPITAL BARROS LUCO TRUDEAU

José J. Vargas Herrera  
MINISTRO DE FE

- Dr. L.L.P./Dr. P.Z.M./ Abog.AMR/jcq  
Distribución:
- Investigador
  - Dirección HBLT
  - Subdirec. Médica Área Quirúrgica
  - Subdirec. Médica Gestión Clínica
  - Dirección CIDT
  - Subdirección Administrativa
  - Subdirec. Procesos - Unidad Transparencia
  - Subdirec. Unidades de Apoyo
  - Unidad de Estudios Asistenciales
  - Asesoría
  - Oficina de Partes



## Anexo 6: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)

Se determinó la presencia del polimorfismo COX-2 -765 G>C mediante PCR-RFLP según la técnica de Shin W. *et al* (2012).

- **Condiciones de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)**

Se prepararon las condiciones para la amplificación de un fragmento de 309 pb del gen COX-2. La fórmula de reacción corresponde a la indicada en la tabla N° 24.

	Fórmula para una muestra	
Agua nanopura	csp. 25 µL	
Tampón de reacción 5X*	5 µL	
Partidor <i>Forward</i> 100 nM	0,25 µL	5'-AGGCAGGAAACTTTATATTGG -3'
Partidor <i>Reverse</i> 100 nM	0,25 µL	5'-ATGTTTTAGTGACGACGCTTA -3'
<i>Taq</i> polimerasa 5 UI/ µL	0,40 µL	
ADN genómico	Volumen equivalente a 5 – 50 ng de ADN genómico	

Fórmula para amplificación por PCR de un fragmento de gen COX-2 para genotipificación de rs20417 (-765 G>C).

\*Tampón de reacción conteniendo dNTPs 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, aceleradores y estabilizadores.

- **Programa de amplificación de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)**

Se amplificó el fragmento en un Termociclador G-storm (modelo: GS00482) según el programa de amplificación por PCR indicado en la tabla N° 25.

	Condiciones y tiempo	Cantidad de Ciclos
Denaturación	95° C – 5 minutos	1 ciclo
Amplificación	95° C – 30 segundos	35 ciclos
	60° C – 30 segundos	
	72° C – 30 segundos	
Enfriamiento	12° C – 1 minuto	1 ciclo

Programa de amplificación para PCR utilizado en la determinación del genotipo rs20417 del gen COX-2 (-765 G>C).

Se visualizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- **Digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)**

Para la digestión de los amplicones obtenidos para la genotipificación de COX-2 rs20417 se utilizó la fórmula indicada en la tabla N° 26.

**Tabla 26: Fórmula para digestión del producto de PCR de COX-2 rs20417 (-765 G>C)**

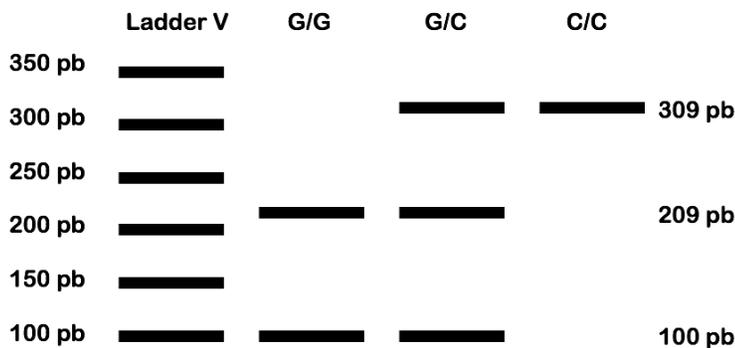
	Fórmula para una muestra
Agua nanopura	8,5 µL
Tampón O 10X	1 µL
Enzima de restricción SsiI 5 UI/ µL	0,5 µL
Amplicón 309 pb	5 µL

Fórmula para digestión del amplicón generado por PCR para COX-2 rs20417 (-765 G>C).

La digestión de los amplicones se realizó por un periodo de 2 horas a 37°C. Los resultados de la digestión se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

- **Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs20417 (-765 G>C)**

En el genotipo homocigoto silvestre (wt= G/G), se observan dos fragmentos de 100 pb y de 209 pb tras la digestión, en el genotipo homocigoto mutado (mut=C/C) se observa el amplicón de 309 pb sin alterar, y para el genotipo heterocigoto (het=G/C) se observan las tres bandas (309 pb, 209 pb y 100 pb).



**Figura 10:** Esquema de patrón de bandas de digestión según genotipo para COX-2 rs20417 (-765 C>G). Se observa el patrón de bandas para el genotipo G/G (izquierda), G/C (centro) y C/C (derecha).

## Anexo 7: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)

Se determinó la presencia del polimorfismo COX-2 -1195 A>G mediante técnica de PCR-RFLP según la técnica de Shin W. et al (2012).

- **Condiciones de PCR para genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

Se prepararon las condiciones para la amplificación de un fragmento de 273 pb del gen COX-2. La fórmula de reacción corresponde a la indicada en la tabla N° 27.

**Tabla 27: Fórmula de PCR para amplificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

	Fórmula para una muestra	
Agua nanopura	csp. 25 µL	
Tampón de reacción 5X	5 µL	
Partidor <i>Forward</i> 100 nM	0,25 µL	5'-CCCTGAGCACTACCCATGAT -3'
Partidor <i>Reverse</i> 100 nM	0,25 µL	5'-GCCCTTCATAGGAGATACTGG -3'
Taq polimerasa 5 UI/ µL	0,40 µL	
ADN genómico	Volumen equivalente a 5 – 50 ng de ADN genómico	

Fórmula para amplificación por PCR de un fragmento de gen COX-2 para genotipificación de rs689466 (-1195 A>G)

- **Programa de amplificación de PCR para genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

Se amplificó el fragmento en un Termociclador G-storm (modelo: GS00482) según el programa de amplificación por PCR indicado en la tabla N° 28.

**Tabla 28: Programa de amplificación de PCR para genotipificación de rs689466 del gen COX-2 (-1195 A>G)**

	Condiciones y tiempo	Cantidad de Ciclos
<b>Denaturación</b>	95° C – 5 minutos	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	95° C – 30 segundos	35 ciclos
	60° C – 30 segundos	
	72° C – 30 segundos	
<b>Enfriamiento</b>	12° C – 1 minuto	1 ciclo

Programa de amplificación para PCR utilizado en la determinación del genotipo rs689466 del gen COX-2 (-1195 A>G)

Se visualizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- **Digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

Para la digestión de los amplicones obtenidos para la genotipificación de COX-2 rs689466 se utilizó la fórmula indicada en la tabla N°29.

**Tabla 29: Fórmula para digestión del producto de PCR de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

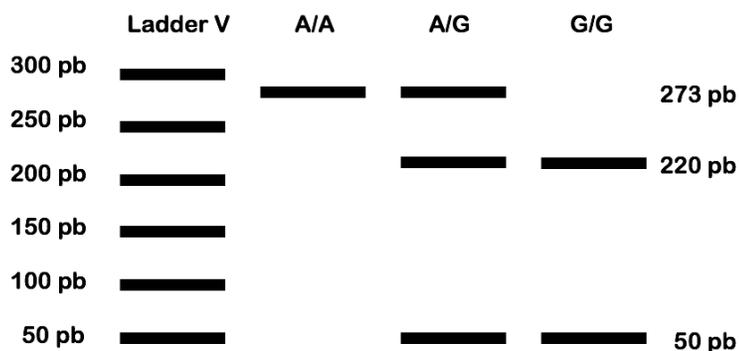
	Fórmula para una muestra
Agua nanopura	8,5 µL
Tampón G 10X	1 µL
Enzima de restricción <i>PvuII</i> 5 UI/ µL	0,5 µL
Amplicón 273 pb	5 µL

Fórmula para digestión del amplicón generado por PCR para COX-2 rs689466 (-1195 A>G)

La digestión de los amplicones se realizó por un periodo de 2 horas a 37°C. Los resultados de la digestión se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 18%.

- **Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de COX-2 rs689466 (-1195 A>G)**

En el genotipo homocigoto silvestre (wt=A/A), se observa un fragmento de 273 pb tras la digestión, en el genotipo homocigoto mutado (mut=G/G) se observan dos fragmentos de 220 y 50 pb, y para el genotipo heterocigoto se (het=A/G) observan las tres bandas (273 pb, 220 pb y 50 pb).



**Figura 11:** Esquema de patrón de bandas de digestión según genotipo para COX-2 rs689466 (-1195 A>G). Se observa el patrón de bandas para el genotipo A/A (izquierda), A/G (centro) y G/G (derecha).

## Anexo 8: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)

Se determinó la presencia del polimorfismo EGF +61 A>G mediante PCR-RFLP según la técnica de Aráujo A. *et al* (2011).

- **Condiciones de PCR para genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)**

Se prepararon las condiciones para la amplificación de un fragmento de 242 pb del gen EGF. La fórmula de reacción corresponde a la indicada en la tabla N° 30.

	Fórmula para una muestra	
Agua nanopura	csp. 25 µL	
Tampón de reacción 5X*	5 µL	
Partidor <i>Forward</i> 100 nM	0,25 µL	5'-TGTCCTAAAGGAAAGGAGGT-3'
Partidor <i>Reverse</i> 100 nM	0,25 µL	5'-TTCACAGAGTTTAACAGCCC-3'
Taq polimerasa 5 UI/ µL	0,40 µL	
ADN genómico	Volumen equivalente a 5 – 50 ng de ADN genómico	

Fórmula para amplificación por PCR de un fragmento de gen EGF para genotipificación de rs4444903 (+61 A>G).

- **Programa de amplificación de PCR para genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)**

Se amplificó el fragmento en un Termociclador G-storm (modelo: GS00482) según el programa de amplificación por PCR indicado en la tabla N° 31.

	Condiciones y tiempo	Cantidad de Ciclos
Denaturación	95° C – 5 minutos	1 ciclo
Amplificación	95° C – 30 segundos	35 ciclos
	55° C – 30 segundos	
	72° C – 30 segundos	
Enfriamiento	12° C – 1 minuto	1 ciclo

Programa de amplificación para PCR utilizado en la determinación del genotipo rs4444903 (+61 A>G) de EGF.

Se visualizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- **Digestión de producto de PCR para genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)**

Para la digestión de los amplicones obtenidos para la genotipificación de EGF rs4444903 se utilizó la fórmula indicada en la tabla N°32.

**Tabla 32: Fórmula para digestión del producto de PCR de EGF rs4444903 (+61 A>G)**

	Fórmula para una muestra
Agua nanopura	8,5 µL
Tampón Tango 10X	1 µL
Enzima de restricción <i>AfuI</i> 5 UI/ µL	0,5 µL
Amplicón 242 pb	5 µL

Fórmula para digestión del amplicón generado por PCR para EGF rs4444903 (+61 A>G).

La digestión de los amplicones se realizó por un periodo de 2 horas a 37°C. Los resultados de la digestión fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

- **Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de EGF rs4444903 (+61 A>G)**

Tras la digestión el genotipo homocigoto silvestre (wt=A/A), presenta 4 fragmentos de 15, 34, 91 y 102 pb, en el genotipo homocigoto mutado (mut=G/G) se observan sólo los fragmentos de 15, 34 y 193 pb, y para el genotipo heterocigoto se (het=A/G) observan todos los fragmentos (15, 34, 91, 102 y 193 pb).



**Figura 12:** Esquema de patrón de bandas de digestión según genotipo para EGF rs4444903 (+61 A>G). Se observa el patrón de bandas para el genotipo A/A (izquierda), A/G (centro) y G/G (derecha).

## Anexo 9: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)

Se determinó la presencia del polimorfismo EGF R521K G>A mediante PCR-RLFP según la técnica de Mustafa O.H. *et al* (2013).

- **Condiciones de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

Se prepararon las condiciones para la amplificación de un fragmento de 155 pb del gen EGFR. La fórmula de reacción corresponde a la indicada en la tabla N° 33.

	Fórmula para una muestra	
Agua nanopura	csp. 25 µL	
Tampón de reacción 5X*	5 µL	
Partidor <i>Forward</i> 100 nM	0,25 µL	5'-TGCTGTGACCCACTCTGTCT-3'
Partidor <i>Reverse</i> 100 nM	0,25 µL	5'-CCAGAAGGTTGCACTTGTCC-3'
<i>Taq</i> polimerasa 5 UI/ µL	0,40 µL	
ADN genómico	Volumen equivalente a 5 – 50 ng de ADN genómico	

Fórmula para amplificación por PCR de un fragmento de gen EGFR para genotipificación de rs2227983 (R521K G>A).

- **Programa de amplificación de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

Se amplificó el fragmento en un Termociclador G-storm (modelo: GS00482) según el programa de amplificación por PCR indicado en la tabla N° 34.

	Condiciones y tiempo	Cantidad de Ciclos
<b>Denaturación</b>	95° C – 5 minutos	1 ciclo
<b>Amplificación</b>	95° C – 30 segundos	35 ciclos
	59° C – 30 segundos	
	72° C – 30 segundos	
<b>Enfriamiento</b>	12° C – 1 minuto	1 ciclo

Programa de amplificación para PCR utilizado en la determinación del genotipo rs2227983 (R521K G>A) de EGFR.

Se visualizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- **Digestión de producto de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

Para la digestión de los amplicones obtenidos para la genotipificación de EGFR rs2227983 se utilizó la fórmula indicada en la tabla N°35.

**Tabla 35: Fórmula para digestión del producto de PCR de EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

	Fórmula para una muestra
Agua nanopura	8,5 µL
Tampón R 10X	1 µL
Enzima de restricción <i>Mva</i> I 5 UI/ µL	0,5 µL
Amplicón 155 pb	5 µL

Fórmula para digestión del amplicón generado por PCR para EGFR rs2227983 (R521K G>A).

La digestión de los amplicones se realizó por un periodo de 2 horas a 37°C. Los resultados de la digestión fueron visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 18%.

- **Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de EGFR rs2227983 (R521K G>A)**

Tras la digestión el genotipo homocigoto silvestre (wt=G/G), presenta 3 fragmentos de 38, 50 y 67 pb, en el genotipo homocigoto mutado (mut=A/A) se observan dos fragmentos de 38 y 117 pb, y para el genotipo heterocigoto (het=A/G) se observan todos los fragmentos (38, 50, 67 y 117 pb).



**Figura 13:** Esquema de patrón de bandas de digestión según genotipo para EGFR R521K G>A. Se observa el patrón de bandas para el genotipo G/G (izquierda), G/A (centro) y A/A (derecha).

## Anexo 10: Técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)

Se determinó la presencia del polimorfismo P53 codón 72 G>C mediante PCR-RFLP según la técnica de O. de la Calle Martin *et al.* (1990).

- **Condiciones de PCR para genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)**

Se prepararon las condiciones para la amplificación de un fragmento de 259 pb del gen P53. La fórmula de reacción corresponde a la indicada en la tabla N° 36.

	Fórmula para una muestra	
Agua nanopura	csp. 25 µL	
Tampón de reacción 5X	5 µL	
Partidor <i>Forward</i> 100 nM	0,25 µL	5'-AATGGATGATTTGATGCTGTCCC -3'
Partidor <i>Reverse</i> 100 nM	0,25 µL	5'-CGTGCAAGTCACAGACTTGGC-3'
Taq polimerasa 5 UI/ µL	0,40 µL	
ADN genómico	Volumen equivalente a 5 – 50 ng de ADN genómico	

Fórmula para amplificación por PCR de un fragmento de gen P53 para genotipificación de rs1042522 (R72P G>C).

- **Programa de amplificación de PCR para genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)**

Se amplificó el fragmento en un Termociclador G-storm (modelo: GS00482) según el programa de amplificación por PCR indicado en la tabla N° 37.

	Condiciones y tiempo	Cantidad de Ciclos
Denaturación	95° C – 5 minutos	1 ciclo
Amplificación	95° C – 30 segundos	35 ciclos
	56° C – 30 segundos	
	72° C – 30 segundos	
Enfriamiento	12° C – 1 minuto	1 ciclo

Programa de amplificación para PCR utilizado en la determinación del genotipo rs1042522 (R72P G>C) de P53.

Se visualizó el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

- **Digestión de producto de PCR para genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)**

Para la digestión de los amplicones obtenidos para la genotipificación de P53 rs1042522 se utilizó la fórmula indicada en la tabla N° 38.

**Tabla 38: Fórmula para digestión del producto de PCR de P53 rs1042522 (R72P G>C)**

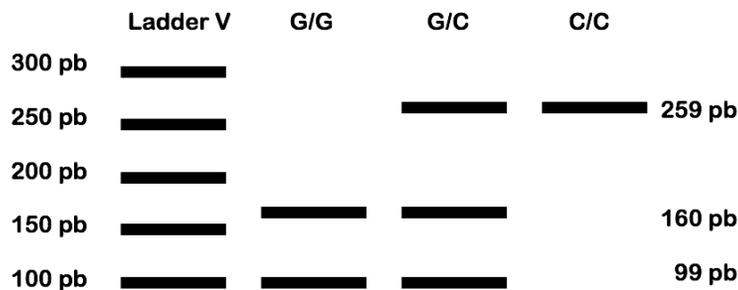
	Fórmula para una reacción
Agua nanopura	8,5 µL
Tampón R 10X	1 µL
Enzima de restricción <i>Bst</i> UI 5 UI/ µL	0,5 µL
Amplicón 259 pb	5 µL

Fórmula para digestión del amplicón generado por PCR para P53 rs1042522 (R72P G>C).

La digestión de los amplicones se realizó por un periodo de 2 horas a 37°C. Los resultados de la digestión se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 18%.

- **Esquema del patrón de fragmentos de digestión de producto de PCR para genotipificación de P53 rs1042522 (R72P G>C)**

En el genotipo homocigoto silvestre (wt= G/G), se observan dos fragmentos de 160 pb y de 99 pb tras la digestión. En el genotipo homocigoto mutado (mut=C/C) se observa el amplicón de 259 pb sin alterar, y para el genotipo heterocigoto (het=G/C) se observan las tres bandas (259 pb, 160 pb y 99 pb).



**Figura 14:** Esquema de patrón de bandas de digestión según genotipo para P53 rs1042522 (R72P G>C). Se observa el patrón de bandas para el genotipo G/G (izquierda), G/C (centro) y C/C (derecha).

## Anexo 11: Etapificación del cáncer y tratamiento en pacientes con cáncer de laringe

**Tabla 39: Características de estadio patológico y tratamiento en pacientes CL**

Estadio tumoral en pacientes con cáncer de laringe			Tratamiento inicial en pacientes con CL		
I	18	17,8%	D.C. + Q.T. + Rö	16	15,8%
II	19	18,8%	D.C. + Rö	8	7,9%
III	13	12,9%	Rö + Q.T.	9	8,9%
IVA	33	32,7%	Rö	11	10,9%
IVB	2	2,0%	D.C.	17	16,8%
IVC	3	3,0%	S.T.	24	23,8%
Multicéntrico	1	1,0%	N.D.	16	15,8%
N.D.	12	11,9%			

Clasificación de estadio tumoral en pacientes con CL y tratamiento. D.C.= Disección quirúrgica, Rö= Radioterapia, Q.T.= Quimioterapia, S.T.= Sin Tratamiento, N.D.= Sin información.

## Anexo 12: Cantidad de muestras genotipificadas para cada variante según grupo de estudio.

**Tabla 40: Cantidad y porcentaje de muestras exitosamente genotipificadas para cada variante**

	Pacientes (casos)	Voluntarios (Controles)
COX-2 rs20417(-765 G>C)	100 (100%)	126 (90,6%)
COX-2 rs689466 (-1195A>G)	100 (100%)	126 (90,6%)
EGF rs4444903(+61 A>G)	100 (100%)	128 (92,1%)
EGFR rs2227983(R521K G>A)	100 (100%)	134 (96,4%)
P53 rs1042522(R72P G>C)	100 (100%)	121 (87,1%)

Cantidad y porcentaje de muestras exitosamente genotipificadas para rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 en los grupos de casos y de controles.

### Anexo 13: Equilibrio de Hardy-Weinberg

**Tabla 41: Determinación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas de COX-2rs20417 y rs689466, EGF rs4444903, EGFR rs2227983 y P53 rs1042522 determinadas en el grupo de controles**

Variante	N	Frecuencia genotípica obtenida	Frecuencia genotípica esperada en equilibrio H.W.	$\chi^2$	P Value
rs20417 COX-2 -765 G>C	G/G: 87 G/C: 37 C/C: 2	0,6905 0,2937 0,0159	0,7011 0,2725 0,0265	0,763	0,3825
rs689466 COX-2 - 1195A>G	A/A: 50 A/G: 63 G/G: 13	0,3968 0,5000 0,1032	0,4184 0,4569 0,1247	1,122	0,2895
rs4444903 EGF +61 A>G	G/G: 43 G/A: 65 A/A: 20	0,3359 0,5078 0,1563	0,3479 0,4839 0,1682	0,314	0,5754
<b>rs2227983</b> <b>EGFR R521K</b> <b>G&gt;A</b>	G/G: 79 G/A: 45 A/A: 10	0,5896 0,3358 0,0746	0,5737 0,3674 0,0588	0,991	0,3194
rs1042522 P53 R72P G>C	G/G: 76 G/C: 39 C/C: 6	0,6281 0,3223 0,0496	0,6229 0,3327 0,0444	0,117	0,7322

Determinación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas de rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2, rs4444903 (+61 A>G) del gen EGF, rs2227983 (R521K G>A) del gen EGFR y rs1042522 (R72P G>C) del gen P53 determinadas en el grupo de controles. Se define que las frecuencias para un SNP se encuentran en equilibrio de H.W. si el valor de Chi cuadrado obtenido es menor a 3,81, con un grado de libertad y una probabilidad de error tipo 1  $\alpha=0,05$ .

**Anexo 14: Prueba de equilibrio de ligamiento para COX-2 rs20417 y COX-2 rs689466**

**Tabla 42: Prueba de equilibrio de ligamiento para COX-2 rs20417 (-765G>C) y COX-2 rs689466 (-1195A>G)**

R Squared = 0,102		D' 1,000	
Haplotipo	Frecuencia	Frecuencia esperada en equilibrio de ligamiento	
CG	0,000	0,057	
GG	0,358	0,296	
CA	0,154	0,105	
GA	0,488	0,542	

Prueba de desequilibrio de ligamiento entre los alelos de los polimorfismos rs20417 (-765G>C) y rs689466 (-1195A>G) del gen COX-2