



FACULTAD

ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE CHILE

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**“Asociación entre la detección de Virus Papiloma Humano y la  
expresión de p16, pRb, p53 y Ki-67 en Carcinoma Oral de Células  
Escamosas”**

*(Tesis adscrita al proyecto FONDECYT N°1120248)*

**Montserrat Reyes Rojas**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN  
PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL

**TUTOR PRINCIPAL**

Prof. Gonzalo Rojas A.

**TUTORES ASOCIADOS**

Prof. Francisco Aguayo G.

Prof. Ana Verónica Ortega

**Santiago-Chile  
2014**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

**MONTSERRAT REYES ROJAS**

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Patología y medicina oral en examen rendido el día 11 de Diciembre del 2014.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Dra. Marcela Hernández

Dr. Ricardo Soto

Dr. Vicente Torres

***“Siempre parece imposible, hasta que se hace”***

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a mi familia por su apoyo incondicional durante estos años.

A mi profesora y amiga María Eugenia Franco por alentarme a comenzar este camino.

Al Dr. Gonzalo Rojas por ser el profesor que me guio en la realización de esta tesis y también un gran amigo.

A la Dra. Ana Verónica Ortega y al Dr. Francisco Aguayo por ser los profesores que me ayudaron y orientaron en este proyecto.

A mi grandes amigos Andrea y Juan Pablo, gracias por su apoyo y amistad en todo momento.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b>	8-9
<b>1.2 MARCO TEÓRICO</b>	9
1.2.1 Virus Papiloma Humano (VPH)	9
1.2.2 Estructura y clasificación	9-10
1.2.3 Organización Genómica	10-11
1.2.4 Proteína E6	11-12
1.2.5 Proteína E7	12-13
1.2.6 Ciclo de Vida del VPH	14
1.2.7 Integración del VPH en el genoma celular	14-15
1.2.8 Detección del VPH mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	15
1.2.9 Carcinogénesis inducida por VPH	16
1.2.10 Genes Supresores Tumorales (GSTs) asociados al VPH	16
1.2.10.1 Proteína p53	17
1.2.10.2 Proteínas p16 y pRb	18
1.2.11 Ki-67 y su asociación al VPH	18-19
1.2.12 Detección de proteínas mediante técnica Inmunohistoquímica (IHQ)	19-20
1.2.13 Cáncer de Cabeza y Cuello (CCC) y su asociación con VPH	20
1.2.14 Cáncer Oral (CO) y su asociación con VPH	21
1.2.15 COCE y su asociación con VPH	21-22
<b>2. HIPÓTESIS</b>	23
<b>3.- OBJETIVO GENERAL</b>	23
<b>3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	23
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	24
<b>4.1- DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	24
<b>4.2- FUENTES DE INFORMACIÓN</b>	24
<b>4.3- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA</b>	24
4.3.1- Selección de la Muestra	24
4.3.2- Criterios de Inclusión	24-25
4.3.3- Criterios de Exclusión	25
4.3.4- Tamaño de la Muestra	25
<b>4.4 PROCEDIMIENTO</b>	25
4.4.1 Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH	25
4.4.2 Recopilación de datos clínicos	26
4.4.3 Preselección de los casos registrados	26
<b>4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	26-28

<b>4.6 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)</b>	28-29
4.6.1 Procesamiento previo a la técnica IHQ	29
4.6.2 Técnica IHQ	29
<b>4.7 RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	30
4.7.1 Recuento de células inmunopositivas	30
<b>4.8 VARIABLES DEL ESTUDIO</b>	31
<b>4.9 CONTROLES DE CALIDAD</b>	31-32
<b>4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	33
<b>5. RESULTADOS</b>	34
5.1 Determinar la presencia de VPH 16/18 en COCE	34-35
5.1.1 Caracterización de las muestras de COCE en ausencia o presencia de VPH	35-37
5.2 Determinar el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE	37-38
5.3 Determinar la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE	39
Imágenes	40-43
<b>6. DISCUSIÓN</b>	44-50
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	50
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	50-51
<b>9. FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO</b>	51
<b>10. CONDICIONES ETICAS</b>	51
<b>11. RESUMEN</b>	52
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	53-60
<b>13. ANEXO 1</b>	61-66

## **LISTADO DE ABREVIACIONES**

VPH	Virus papiloma humano
CCU	Cáncer de cuello uterino
CCC	Cáncer de cabeza y cuello
CCE	Carcinoma de células escamosas
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	Marco abierto de lectura
URR	Región larga no codificante
LCR	Región larga de control (Long control región)
GST	Gen supresor de tumor
Cdk	Quinasas dependientes de ciclinas
CO	Cáncer oral
IHQ	Inmunohistoquímica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
H-E	Hematoxilina-eosina
ABC	Complejo avidina - biotina
SAP-FOUCH	Servicio de anatomía patológica-Facultad de odontología Universidad de Chile
INC	Instituto Nacional del Cáncer
OMS	Organización Mundial de la Salud
DAB	Tetrahydrocloruro de Diaminobencidina
PBS	Buffer fosfato salino
HIS	Hibridación in situ

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

La búsqueda de una causa infecciosa en los cánceres humanos sigue siendo un tema de gran interés.

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

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

La etiología del cáncer oral y en particular la del carcinoma oral de células escamosas (COCE) es desconocida, aunque existen factores de riesgo asociados, entre ellos, el tabaco y el alcohol. Sin embargo, estos tumores también se desarrollan entre un 10 a un 20% en personas que nunca han fumado y que no beben alcohol, abriéndose por lo tanto la posibilidad de participación de otros agentes, como las infecciones virales. No obstante, la participación del VPH en el desarrollo del COCE, así como también los mecanismos por los cuales induce la transformación maligna sigue siendo un tema de debate. Por lo anteriormente señalado, resulta de interés determinar la presencia de VPH en muestras de COCE en la población chilena y establecer si existe una asociación entre la infección por VPH y la expresión de moléculas relacionadas al control del ciclo celular, a la actividad proliferativa y a la inhibición de la apoptosis. Esto se fundamenta en la cierta analogía y similitud con la situación encontrada tanto en CCU, tumores anogenitales y cáncer orofaríngeo, ya que tanto la presencia como el rol etiopatogénico del VPH en COCE es controvertido y cada serie de casos presenta resultados distintos y no existen

estudios similares en nuestro país. El objetivo de este estudio fue determinar la asociación que existe entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE, lo cual puede tener implicaciones no sólo para el diagnóstico y una mejor comprensión de la fisiopatología del COCE, sino también en su prevención y tratamiento.

## **1.2 MARCO TEÓRICO**

### **1.2.1 Virus Papiloma Humano (VPH)**

El VPH es un pequeño virus que pertenece a la familia Papillomaviridae, es de simetría icosaédrica, carece de envoltura, posee un ADN circular con 8000 pares de bases como material genético y un tropismo epitelial estricto (zur Hausen, 2009).

Se ha reportado la existencia de más de 150 tipos diferentes de VPH, sin embargo, solo se ha secuenciado el genoma completo de unos 100 tipos (de Villiers et al., 2004, Bernard, 2005, Sand and Jalouli, 2014).

### **1.2.2 Estructura y Clasificación**

Los virus que pertenecen a la familia Papillomaviridae, presentan una cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura y su tamaño oscila entre los 40 y 55 nanómetros. Su genoma constituye entre el 10 al 13% del peso de la partícula viral y consta de una molécula no segmentada y circular de ADN de doble cadena (zur Hausen, 2009).

La familia Papillomaviridae se divide en cinco géneros compuestos por los virus papiloma alfa, beta, gamma, mu, y nu. Sólo el virus del papiloma tipo alfa y beta infectan a los seres humanos, el primero presenta un tropismo en la mucosa y el segundo un tropismo en la piel (de Villiers et al., 2004).

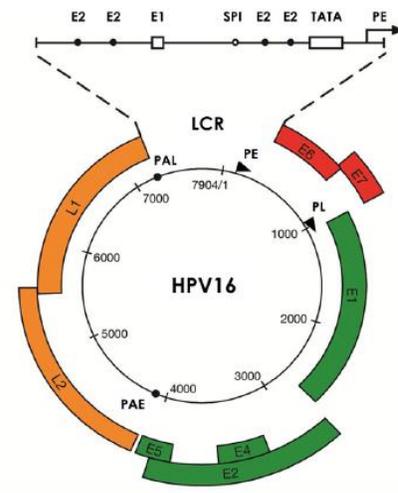
El VPH se ha clasificado de acuerdo a sus genotipos en bajo y alto riesgo según el riesgo de desarrollo de CCU. Los VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, entre otros) son la principal causa de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y del cáncer cervical invasor, mientras que los tipos de bajo riesgo (6,11) están asociados con lesiones benignas en el tracto anogenital tales como el condiloma acuminado (Bernard, 2005). En

tumores genitales y extragenitales el genotipo de VPH más prevalente es el tipo 16. En el cáncer cervical el VPH-16 está presente en el 55% de los tumores y en cáncer extragenital cerca del 80% de las muestras positivas para VPH portan este genotipo (Schiffman et al., 2007). El VPH-18 es el segundo genotipo más prevalente (Bodily and Laimins, 2011).

### 1.2.3 Organización genómica

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

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



**Figura 1.** Genoma circular de VPH-16 (Doorbar et al., 2012).

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

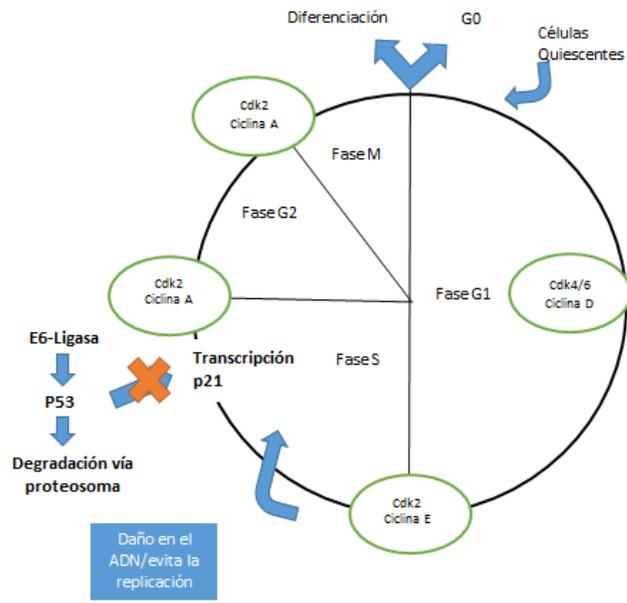
Además de estas dos regiones, todos los VPH poseen una región de control larga no codificante URR o long control region (LCR), que separa los ORF tempranos y tardíos, la cual contiene secuencias de control de la transcripción e inicio de la replicación (Doorbar et al., 2012).

#### **1.2.4 E6**

El gen E6 codifica una proteína que posee 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 kDa y contiene dos dedos de zinc Cys-X-X-Cys altamente conservados, cuya integridad es esencial para su función (Mantovani and Banks, 2001).

Esta proteína es una de las primeras que se expresan durante el ciclo infectivo viral y en los VPH de alto riesgo se encuentra localizada en el núcleo y en el citoplasma de la célula huésped. Tiene la capacidad de unirse a un conjunto de blancos celulares lo que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, inhibir la diferenciación celular, las interacciones célula-célula e incrementar la inestabilidad cromosómica. Todos estos procesos son fundamentales en el establecimiento de la carcinogénesis (Thomas et al., 1999, Munger and Howley, 2002, Hahn and Weinberg, 2002, Chakrabarti and Krishna, 2003).

La proteína E6 de los VPH de alto riesgo puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 como parte de un complejo trimérico junto a la ligasa de ubiquitina celular E6AP, lo cual provoca la ubiquitinización de p53 y su posterior degradación vía proteasoma (Figura 2), llevando a una reducción de la vida media de esta proteína (Thomas et al., 1999).



**Figura 2.** Asociación de p53 y E6-Ligasa, lo cual provoca la ubiquitinización de p53 y su posterior degradación. Esquema adaptado de (McLaughlin-Drubin and Munger, 2013).

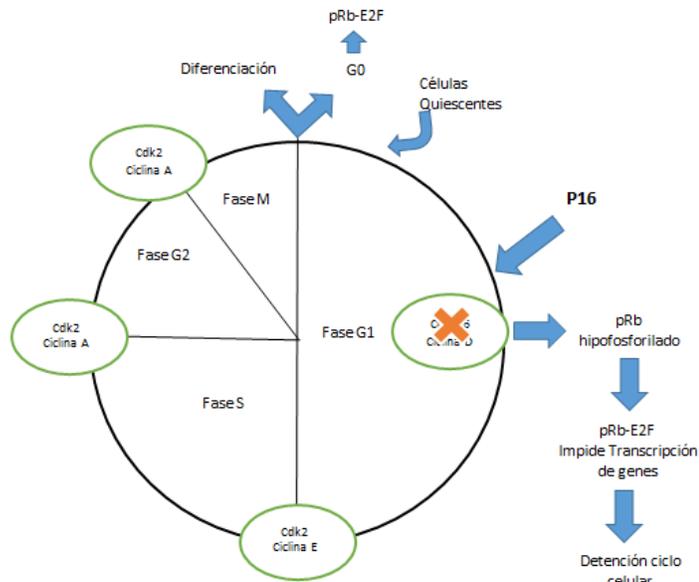
### 1.2.5 E7

La proteína E7 del VPH es un pequeño polipéptido de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y se encuentra mayoritariamente en el núcleo (Munger and Howley, 2002). La principal acción de esta proteína es su habilidad para asociarse a las proteínas de la familia pRb (Boulet et al., 2007).

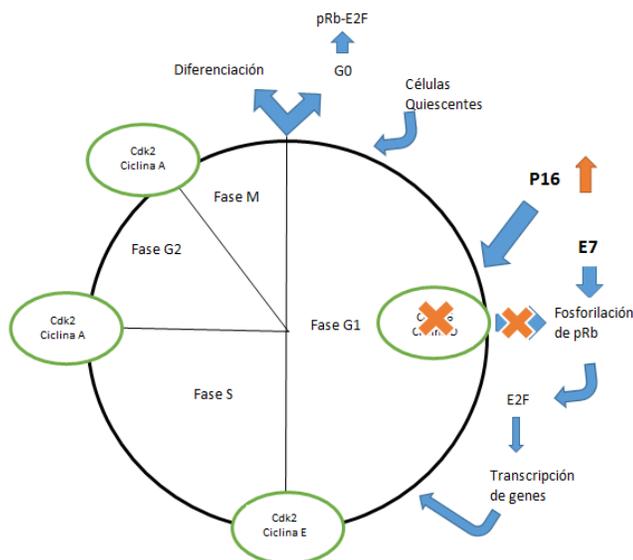
El estado de fosforilación de la proteína pRb es regulado durante el ciclo celular, encontrándose hipofosforilada en etapas G0 y G1 y fosforilada durante las fases S, G2 y M. La forma hipofosforilada posee como función la inhibición de la progresión del ciclo celular (Figura 3) (Boulet et al., 2007). pRb se fosforila mediante una quinasa dependiente de ciclina (Cdk) conduciendo a la liberación de los factores de transcripción E2F, permitiendo la progresión de la célula a fase S (Figura 4) (Munger and Howley, 2002).

E7 se une preferentemente a la forma hipofosforilada de pRb y ocasiona su degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma, lo que también permite la liberación de E2F. Este evento iniciaría la síntesis de ADN y la proliferación celular (Chakrabarti and Krishna, 2003, Yugawa and Kiyono, 2009).

La función viral de E6 y de E7 es controlar el medio celular para la replicación del genoma viral, la activación de vías transcripcionales y la inducción de síntesis de ADN, además de promover el crecimiento y desarrollo celular (Boulet et al., 2007).



**Figura 3.** El estado de fosforilación de la proteína pRb es regulado durante el ciclo celular, encontrándose hipofosforilada en etapas G0 y G1. En este estado hipofosforilado pRb es capaz de unirse al factor de transcripción E2F, lo cual impide la transcripción de genes, deteniendo el ciclo celular. Esquema Adaptado de (McLaughlin-Drubin and Munger, 2013).



**Figura 4.** pRb se fosforila mediante una quinasa dependiente de ciclina conduciendo a la liberación de los factores de transcripción E2F, permitiendo la progresión de la célula a fase S. E7 se une a la forma hipofosforilada de pRb, causando su degradación y la liberación de E2F, lo que provoca un aumento de P16. Esquema adaptado de (McLaughlin-Drubin and Munger, 2013).

### **1.2.6 Ciclo de vida del VPH**

El ciclo de vida del VPH es exclusivamente intraepitelial. El virus penetra el epitelio a través de microlesiones y se adhiere a la superficie de las células basales por mecanismos poco conocidos, sufriendo un fenómeno de endocitosis con posterior destrucción de la cápside y transporte al núcleo (Horvath et al., 2010). Luego que el virus entra a la célula se pueden desarrollar dos tipos de infección, una latente donde el virus se mantiene sin producción de partículas infecciosas y su ADN permanece libre en el núcleo celular en forma de episoma, cabe señalar que este tipo de infección no desarrolla el efecto citopático característico del VPH. El otro tipo de infección es la productiva, donde se generan grandes cantidades de ADN vírico y la replicación viral ocurre en las células infectadas en las capas intermedias y superficiales del epitelio, en donde factores de transcripción promueven la síntesis de proteínas virales que componen la cápside. Esta infección permite la producción de 20 a 100 copias de ADN viral por célula, en donde E1 y E2 son las primeras proteínas virales expresadas. E1 participa en la replicación del genoma viral y codifica la región más conservada del VPH y junto con E2 suele perderse cuando el VPH aparece integrado en el genoma celular. E2 es una proteína requerida para la regulación de la transcripción y la replicación viral, la cual se efectúa con la división celular en el estrato basal y regula la expresión de los genes E6 y E7. Las proteínas L1 y L2 forman la cápside icosaédrica lo cual da lugar a viriones completos en las capas superficiales del epitelio (Horvath et al., 2010, Chow et al., 2010).

### **1.2.7 Integración del VPH en el genoma celular**

Normalmente el genoma del VPH se encuentra en estado circular en el estrato basal del epitelio escamoso, en este estado la expresión de E6 y E7 está regulada por la proteína viral E2 (Munger and Howley, 2002), ya que el producto del gen E2 se une al ADN viral permitiendo la transcripción del gen E1, regulando la transcripción de los genes E6 y E7 (Munger et al., 2001). Al integrarse el ADN del VPH al ADN del hospedero se pierde el ORF del gen E2, lo que provoca la pérdida del producto E2, por lo tanto E6 y E7 son expresados con mayor intensidad, lo cual puede desregular el ciclo celular. Por lo tanto, la persistencia e integración del VPH de alto riesgo en el genoma del hospedero

es característica del potencial oncogénico de este virus. En resumen, dos eventos moleculares son importantes, la integración del virus en el genoma del hospedero y la sobreexpresión de E6/E7 por pérdida de E2 (Horvath et al., 2010).

### **1.2.8 Detección del VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica de amplificación selectiva de una secuencia específica de ácidos nucleicos. Esta técnica posee características ideales para la detección, identificación y estudio de las propiedades de VPH. Su sensibilidad permite detectar hasta una copia de genoma viral por un millón de células (Abreu et al., 2012, Jordan et al., 2012).

El tejido fijado en formalina e incluido en parafina constituye un tipo de espécimen abundante en laboratorios de patología. Aunque el ADN que es posible obtener desde este tipo de material está frecuentemente fragmentado, es posible usarlo con fines de detección de secuencias virales (Hwang and Lee, 2012). El grado de fragmentación del ADN generalmente depende tanto del tiempo de exposición a la formalina como del tiempo de almacenamiento, por lo cual se realiza una evaluación de calidad del ADN genómico mediante amplificación de un fragmento del gen  $\beta$ -globina bajo sus propias condiciones de PCR. Este PCR tiene como objetivo evaluar la calidad del ADN y su utilidad para servir como templado para la amplificación de fragmentos superiores a 200 pb; esto permite la posibilidad de efectuar estudios retrospectivos con amplias series de pacientes, ya que a partir de cortes de 10  $\mu$ m de espesor de tejido incluido en bloques de parafina y tras una amplificación de 40 ciclos pueden detectarse una media de 1 o 2 genomas virales cada 10 células. (Abreu et al., 2012); es por esto que la PCR es actualmente el método de detección viral más comúnmente utilizado (Sand and Jalouli, 2014).

Por todo lo anteriormente señalado la detección del VPH a través de PCR es fundamental para la estimación de su prevalencia en diversas enfermedades orales, incluyendo el COCE.

### **1.2.9 Carcinogénesis inducida por VPH**

Si bien, la presencia del ADN del VPH por sí sola no es suficiente evidencia de una asociación causal, desde un punto de vista molecular la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH de alto riesgo se han utilizado como una herramienta útil y confiable para determinar asociación entre la infección por VPH y desarrollo del cáncer (Chakrabarti and Krishna, 2003).

La carga viral local, la distribución viral, la clonalidad de la infección por el VPH, los mecanismos de transcripción del oncogén del VPH, y el sitio específico de la integración viral son todos factores críticos para la comprensión de la oncogénesis por VPH (Chow et al., 2010).

Por lo tanto, la evidencia para el desarrollo de una carcinogénesis inducida por VPH se puede encontrar en primer lugar, en la presencia de secuencias genómicas de VPH de alto riesgo, en conjunto con la expresión de las oncoproteínas E6/E7. En segundo lugar está la existencia de un número importante de copias del ADN viral y por último, la integración del ADN del VPH en el genoma celular. Sin embargo, el ADN viral puede encontrarse de forma episomal, integrado o de ambas formas, lo cual indica que la integración del ADN del VPH no es un evento estrictamente necesario para la carcinogénesis (Mellin et al., 2002).

### **1.2.10 Genes supresores tumorales (GSTs) asociados con VPH**

Mutaciones en los genes que controlan la progresión del ciclo celular y las vías de reparación del ADN son los sucesos iniciadores esenciales del cáncer (Hafkamp et al., 2003). El mecanismo oncogénico de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH de alto riesgo está relacionado con la capacidad de unir e inducir la degradación de p53 y pRb, con la consecuente pérdida de control del ciclo celular y del proceso de apoptosis. Esto permite además la acumulación de eventos relacionados con inestabilidad genética que contribuyen a la carcinogénesis (Hafkamp et al., 2003, Jayasurya et al., 2005).

### 1.2.10.1 Proteína p53

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear compuesta por 393 aminoácidos con un peso molecular de 53 KDa, la cual está codificada por el gen que lleva su mismo nombre (TP53) (Hafkamp et al., 2003).

La proteína p53 mantiene la estabilidad del genoma, por lo tanto, la inactivación, degradación o mutación de TP53 puede desregular sus funciones que resultan en un aumento de la proliferación celular, acumulación del ADN dañado, crecimiento de las células que albergan errores en el ADN y en una sobrevida celular prolongada (Nylander et al., 2000). Sin embargo, la pérdida de la función de p53 por sí sola no es suficiente para el desarrollo de cáncer y otras alteraciones citogenéticas son necesarias para la transformación maligna (Vousden and Prives, 2005, Soussi, 2007).

La variedad “tipo silvestre” o “wild-type” de la proteína normal del gen TP53 está presente en la mayoría de las células normales, pero tiene una vida media corta de pocos minutos. En condiciones normales, esta proteína es regulada por Mdm2, por lo que generalmente es indetectable por medios inmunohistoquímicos (Oh et al., 2013). Sin embargo, al mutar el gen TP53, se traduce una proteína defectuosa que no puede ser degradada, acumulándose por aumento de su vida media, permitiendo de esta manera su detección a través de medios inmunohistoquímicos (Oh et al., 2013, Francis et al., 2013).

La infección por VPH y la mutación de TP53 pueden coexistir con poca frecuencia en un subconjunto de CCC, ya que hay una correlación inversa entre la infección por VPH y la mutación de TP53 (Nylander et al., 2000). Varios autores han reportado una mayor detección de la proteína de TP53 mutado a través de inmunohistoquímica en muestras de biopsias cervicales de pacientes sin infección por el VPH en comparación a muestras VPH positivas. Esto se debe a que en los tumores asociados a infección por VPH, la proteína p53 es degradada vía proteasoma, producto de su unión con E6-ligasa (Figura 2). Por lo tanto, su detección mediante inmunohistoquímica es menor (Nylander et al., 2000, Soussi, 2007, Oh et al., 2013, Francis et al., 2013).

### 1.2.10.2 Proteínas p16 y pRb

p16<sup>INK4a</sup> es una proteína codificada por el GST CDKN2A, que se encuentra funcionalmente inactiva en numerosos tumores, bien por mutación del propio gen CDKN2A o por hipermetilación del promotor (Klussmann et al., 2003). Actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (cdks) y desacelera el ciclo celular inactivando la función del complejo ciclina D/ cdk4-cdk6. Este complejo regula el punto de control de la fase G1 del ciclo celular mediante la fosforilación y la subsiguiente inactivación de pRb, lo cual libera al factor de transcripción E2F y permite a la célula entrar en fase S (Kumar et al., 2008, Lassen et al., 2009). La proteína E7 de los VPH de alto riesgo se une a la forma hipofosforilada de pRb, causando la liberación de E2F y la posterior degradación de pRb, lo cual provoca un aumento de p16 (Figura 4); como ocurre en algunos tipos de tumores VPH positivos en los cuales se ha demostrado la existencia de una correlación recíproca entre pRb y p16, en donde hay una fuerte sobreexpresión nuclear y citoplasmática de la proteína p16 y una disminución de pRb, como se ha visto exclusivamente en las infecciones por VPH de alto riesgo. Esto contrasta con la pérdida frecuente de p16, y un aumento de pRb que se encuentra en tipos de cáncer VPH negativos (Klussmann et al., 2003, Chen et al., 2012a, Chen et al., 2012b). La sobreexpresión de p16 ha sido propuesta como un marcador biológico que permitiría identificar de forma inequívoca las células con cambio displásico o maligno inducido por VPH, ayudando al diagnóstico y solucionando los problemas de variabilidad inter e intra-observador (Keating et al., 2001, Weinberger et al., 2004, Hoffmann et al., 2010, Lewis et al., 2010). Sin embargo, se ha visto en algunos estudios que la expresión de p16 sería independiente a la presencia de VPH en COCE (Nemes et al., 2006, Thomas and Primeaux, 2012).

### 1.2.11 Ki-67 y su asociación con VPH

Ki-67 es una proteína no histona que se expresa en el núcleo durante todo el ciclo celular, excepto en la fase G0 y en las primeras fases de G1, por lo cual es un marcador eficiente de células que proliferan (Dragomir et al., 2012). Algunos estudios consideran que es el marcador tumoral que mejor predice el desarrollo de enfermedad metastásica precoz, constituyendo el principal marcador pronóstico (Mimica et al., 2010). No obstante,

otros estudios indican que la importancia pronóstica de la expresión de Ki-67 en COCE es aún controversial, probablemente debido a que es un marcador de la fracción total de células en proliferación, que corresponde no sólo a las células en proliferación constante, sino también a las células proliferantes destinadas a la diferenciación terminal (Gonzalez-Moles et al., 2010).

Varios estudios comprueban que la proliferación celular medida por la expresión de Ki-67 se correlaciona fuertemente con el grado de diferenciación histológica, indicando que el índice de proliferación medido a través de Ki-67 es significativamente mayor en los tumores de bajo grado de diferenciación, sin embargo, esto no tendría ninguna implicancia en el valor pronóstico de las lesiones (Kurokawa et al., 2005, Cambruzzi et al., 2005, Mimica et al., 2010).

Un estudio realizado el 2012, indicó que las células proliferantes eran más susceptibles a la radiación ionizante, ya que observaron que los tumores con alta actividad proliferativa eran más susceptibles a la terapia de radiación, por lo tanto postulan que Ki-67 podría ser utilizado como un marcador para predecir la respuesta a la terapia de radiación en pacientes con COCE (Freudlsperger et al., 2012). Existen estudios en donde evalúan la expresión de Ki-67 en lesiones intraepiteliales de cuello uterino, en donde se señala que el VPH afecta la expresión de Ki-67, ya que han encontrado que en lesiones asociadas a VPH 16 y 18 la expresión de Ki-67 fue mayor en muestras de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (CIN3) (Mimica et al., 2010). Al parecer el virus promueve alteraciones directas de la mitosis y progresión del ciclo celular, lo cual se puede estimar por un mayor índice de proliferación celular (Mimica et al., 2010, Freudlsperger et al., 2012).

Si bien, no hay estudios que relacionen la presencia del VPH con la expresión de Ki-67 en COCE, suponemos por lo expuesto anteriormente que la detección del VPH 16/18 en COCE se asocia a un mayor recuento de células epiteliales Ki-67 positivas.

### **1.2.12 Detección de proteínas mediante técnica Inmunohistoquímica (IHQ)**

La técnica IHQ combina metodologías inmunológicas y bioquímicas para la detección de un antígeno celular o tisular, mediante el uso de un anticuerpo específico y un sistema marcador. El método de detección más utilizado es el Complejo Avidina-

Biotina (ABC), en donde la unión del antígeno con el anticuerpo primario es seguida de la unión con un anticuerpo secundario biotilado y un complejo ABC. Posteriormente estas uniones son visualizadas a través de un cromógeno.

A través de IHQ utilizamos anticuerpos para detectar la proteína p53 proveniente del gen TP53 mutado y las proteínas p16, pRb y Ki-67 evaluando su expresión en presencia o ausencia de VPH 16/18.

### **1.2.13 Cáncer de cabeza y cuello (CCC) y su asociación con VPH**

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) es un grupo heterogéneo de tumores que incluye la cavidad nasal, senos paranasales, faringe, laringe y la hipolaringe. Son la sexta causa de cáncer más común en el mundo y la cavidad oral representa la localización más frecuente de los tumores malignos primarios de cabeza y cuello. Histológicamente, la mayoría de estos tumores son carcinoma de células escamosas (CCE) y se asocian con el hábito de fumar y/o beber alcohol (Campisi and Giovannelli, 2009, Leemans et al., 2011).

Las similitudes en los aspectos clínicos e histológicos entre las lesiones genitales y orales relacionadas con el VPH llevaron a sugerir en los años 80 que el VPH podría estar involucrado en el desarrollo del CCC. Algunos de los factores que intervienen son el tropismo del VPH por las células epiteliales, el potencial oncogénico del virus y las similitudes morfológicas entre el epitelio genital y orofaríngeo (Gillison, 2004, Kreimer et al., 2005).

Actualmente se acepta el rol del VPH en algunos tipos de CCC, sin embargo la presencia de ADN genómico viral en estos tumores es bastante variable. Algunos autores han demostrado un 13% de casos de infección por VPH en CCC, en cambio en cavidad bucal, la cifra es menor (5%), si se considera sólo los casos en los cuales se demuestra replicación activa del virus. El genotipo más frecuentemente involucrado es el VPH-16 y la presencia de ADN viral es más frecuente en pacientes no fumadores y menores de 60 años (Jung et al., 2010).

### **1.2.14 Cáncer Oral (CO) y su asociación con VPH**

El cáncer oral (CO) es un subtipo de CCC que puede surgir como una lesión de origen primario en los tejidos orales que recubren la boca, labios, encías y la lengua (Huang Liu et al., 2014). Las malignidades orales y orofaríngeas representan aproximadamente el 3% de todos los tumores malignos en hombres y un 2% en mujeres en Estados Unidos (Neville and Day, 2002).

En Chile, un análisis correspondiente al año 2002 dio a conocer que el CO correspondería a un 1,6 % del total de casos de cáncer, estando presente principalmente en hombres de más de 45 años de edad, con una tasa de 2,3:1 en comparación con las mujeres (Riera and Martinez, 2005, Rojas-Alcayaga et al., 2010).

Los tipos de cáncer que se presentan en la boca incluyen neoplasias malignas tales como osteosarcomas de los huesos maxilares, linfomas, adenocarcinomas de glándulas salivales, carcinomas de mucosa oral, entre otros, sin embargo alrededor del 90% son CCE los cuales comúnmente se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa, por lo que son denominados Carcinomas Orales de Células Escamosas (COCE), y representan la sexta neoplasia maligna más común en los países desarrollados (Huang Liu et al., 2014). Sólo entre el 40-50 % de los pacientes sobreviven a los 5 años (Fronie et al., 2013). En general se acepta que el tabaco y el consumo de alcohol son los principales factores de riesgo para el desarrollo del COCE, sin embargo algunos pacientes desarrollan COCE sin la exposición a estos factores de riesgo, este hecho sugiere que causas adicionales, como la predisposición genética, la dieta o presencia de virus oncogénicos podrían ayudar a las células a escapar de los mecanismos de control de la proliferación (Xi et al., 2009).

### **1.2.15 COCE y su asociación con VPH**

La asociación entre la presencia de VPH-16 y VPH-18 con el desarrollo de CCU, así como con el cáncer anal se ha demostrado claramente, por lo cual es sabido que la transmisión del VPH estaría asociada a conductas sexuales (Herrero et al., 2003). En este sentido, se ha sugerido que ciertas prácticas sexuales, como el sexo oral (contacto oral-genital) y otros (contacto oral-anal) y ciertas conductas sexuales (como tener

múltiples parejas sexuales) favorecen la entrada del virus a la cavidad oral y en esta localización podría participar en la iniciación, promoción o progresión tumoral (D'Souza et al., 2010).

Si bien, es más común la detección del VPH en los tumores orofaríngeos y en menor frecuencia en los tumores orales, hasta ahora una eventual función etiológica del VPH en el desarrollo de COCE ha sido muy controversial, ya que los datos en la literatura muestran tasas de infección por VPH muy variables en COCE (Herrero et al., 2003, Campisi et al., 2007). Esta variabilidad puede ser atribuible a los procesos de fijación del tejido biopsiado, al almacenamiento de las muestras, la extracción de ADN, la etnicidad y la geografía (Kreimer et al., 2005, Jordan et al., 2012); pequeño número de muestras analizadas; posible contaminación; técnica utilizada para la detección del virus y el sitio de COCE analizado (Ha and Califano, 2004). Un meta-análisis realizado en el 2001 informó que el VPH estaba presente en el 46,5% de los COCE analizados (Miller and Johnstone, 2001). Sin embargo, otros estudios concluyeron que el VPH en el COCE es relativamente bajo cuando se compara con carcinomas orofaríngeos (Gillison et al., 2008, Pannone et al., 2011, Fronie et al., 2013). No obstante, en Chile no se ha publicado información sobre la prevalencia del VPH y su asociación con COCE.

## **2. HIPÓTESIS**

En resumen:

- Actualmente se acepta el rol del VPH en algunos tipos de CCC, sin embargo la presencia de ADN genómico viral en COCE es bastante variable y su rol es controvertido.
- El genotipo más prevalente en tumores VPH positivos es el VPH-16, seguido por el VPH-18.
- Los cánceres VPH positivos tienen diferentes perfiles biológicos, los cuales se asocian con una sobreexpresión de p16, pérdida de pRb y una disminución de p53.
- En Chile no se ha publicado información sobre la prevalencia del VPH en muestras COCE, como tampoco la expresión de moléculas relacionadas al control del ciclo celular, a la actividad proliferativa y a la inhibición de la apoptosis.

Por lo anteriormente señalado, la hipótesis de este trabajo, es que la detección del VPH 16/18 en COCE se asocia a un mayor recuento de células epiteliales Ki-67 y p16 positivas y a un menor recuento de células epiteliales pRb y p53 positivas, en comparación a COCE VPH 16/18 negativos.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación que existe entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE

### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar la presencia de VPH 16/18 en COCE
- 2) Determinar el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE
- 3) Relacionar la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

El diseño de este estudio fue de tipo observacional analítico de corte transversal.

### **4.2 FUENTE DE INFORMACIÓN**

La fuente de información fueron las fichas clínicas y biopsias en bloques de parafina del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (SAP-FOUCH), entre los años 2000-2014 y del Instituto Nacional de Cáncer (INC) entre los años 2013-2014.

El lugar en donde se llevó a cabo el presente estudio es el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y el Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **4.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

#### **4.3.1 Selección de la muestra**

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

#### **4.3.2 Criterios de inclusión**

- Biopsias cuyo diagnóstico histopatológico fue de un COCE, confirmado por un histopatólogo bucal

- Cantidad suficiente de material fijado e incluido en bloques de parafina que permitiera hacer los análisis de IHQ.

#### **4.3.3 Criterios de exclusión**

- Muestras que tuvieran artefactos de técnica quirúrgica y/o de procesamiento histológico.
- Muestras que fueran recidivas de la lesión inicial.
- Muestras en las cuales no se detectó el gen  $\beta$ -globina mediante PCR

#### **4.3.4 Tamaño de la muestra**

La muestra final corresponde a un total de 80 casos con diagnóstico de COCE.

### **4.4 PROCEDIMIENTO**

#### **4.4.1 Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH**

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

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

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

#### 4.4.2 Recopilación de datos demográficos

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

#### 4.4.3 Preselección de los casos registrados

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

- Reevaluar y confirmar el diagnóstico histopatológico de cada caso.
- Comprobar la presencia suficiente de muestra para realizar la técnica IHQ
- Seleccionar el corte más representativo en los casos en que existía más de una placa histológica.

#### 4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez obtenidas las muestras en moldes de parafina, a cada uno se le realizó 1 corte de 10  $\mu\text{m}$  con una navaja nueva para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. Leitz Wetzlar y fue colocado en un tubo eppendorf el cual estuvo debidamente rotulado con el mismo número del molde de parafina.

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

10 min y fue centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. Después de una extracción con fenol/cloroformo, el ADN obtenido se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000. La amplificación del VPH con los partidores GP5+/GP6+ (Tabla 1) se realizó en una mezcla de reacción que tuvo 2,5 µL de muestra (que tuvo 100 ng de ADN), 200 µM de dNTP, 0,5 µM de cada partidor y 1,0 U de Taq ADN polimerasa (Takara, Japón) en un volumen total de 25 µL de buffer (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-Cl, pH 8,3). El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95° durante 4 min; subsiguientes 45 ciclos a 95°C durante 1 min, 40°C durante 2 min y 72°C durante 1,5 min y la última extensión a 72°C durante 5 min. La amplificación de un fragmento de β-globina con un conjunto de partidores PCO3/PCO4 (fragmento de 110 pb) se utilizó como control positivo interno. El programa de PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95° C durante 4 min, 40 ciclos con el perfil de ciclos de 95°C durante 1 min, 52°C durante 1 min y 72°C durante 2 min y una extensión final de 5 min a 72°C (Aguayo et al., 2007).

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

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

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

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

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencias</b>	<b>pb</b>
VPH-16	Forward 5'-GGTCGGTGGACCGGTCGATG-3' Reverse 5'-GCAATGTAGGTGTATCTCCA-3'	96
VPH-18	Forward 5'-CCTTGGACGTAAATTTTTGG-3' Reverse 5'-CACGCACACGCTTGGCAGGT-3'	115

Las muestras positivas para VPH en las cuales no fue posible la amplificación de VPH 16/18 fueron genotipificadas mediante secuenciación directa. Para esto el fragmento amplificado usando los partidores GP5+/GP6+ fue purificado desde un gel de agarosa usando el Kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), de acuerdo a instrucciones del fabricante. El producto así obtenido fue cuantificado mediante Nanodrop 1000 y enviado a secuenciar en ambos sentidos (usando partidores forward y reverse) a la empresa Macrogen (Corea).

#### **4.6 TÉCNICA IHQ PARA LA DETECCIÓN DE p16, pRb, p53 Y Ki-67**

##### **4.6.1 Procesamiento previo a la técnica IHQ**

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

##### **4.6.2 Técnica IHQ**

Una vez completado el tiempo de secado, las muestras en cada portaobjeto fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. Las secciones se colocaron en buffer citrato de sodio (pH 6) durante 45 min en olla a presión para la recuperación antigénica, y posteriormente fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada

incubando las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol a temperatura ambiente durante 20 min. Las secciones se pre-incubaron con suero de caballo durante 20 min a temperatura ambiente y después se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a 37°C con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos Primarios	Tipo de Anticuerpo	Dilución	Laboratorio Comercial	Código del Producto	Patrón de marcación
Anti-p16	Ac Monoclonal Murino	Prediluido	Biogenex	AM540-5M	Citoplasmática y/o Nuclear
Anti-pRb	Ac Monoclonal Murino	1:50	Thermo	MA1-34070	Nuclear
Anti-p53	Ac policlonal conejo	Prediluido	Cell marque	453R-18	Nuclear
Anti-Ki-67	Ac Monoclonal Murino	Prediluido	Cell marque	275R-18	Nuclear

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

Un corte de cáncer de colon como control positivo para el Anticuerpo p16

Un corte de carcinoma de vejiga como control positivo para el Anticuerpo pRb

Un corte de carcinoma de colon como control positivo para el Anticuerpo p53

Un corte de carcinoma de colon como control positivo para el Anticuerpo Ki-67

## **4.7 RECOLECCION DE LOS RESULTADOS**

### **4.7.1 Recuento de células inmunopositivas**

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

Las células inmunopositivas se evaluaron microscópicamente con un aumento de 40x y se seleccionaron 5 campos de forma no aleatoria, los cuales tuvieran presencia de epitelio neoplásico con áreas de mayor marcación positiva. Esta marcación se evaluó como positiva para la proteína de TP53 mutado, Ki-67 y pRb en el caso de contar con una marca de color pardo en el núcleo de las células epiteliales sin considerar intensidad. Se consideraron células epiteliales p16 positivas, cuando se observó una marcación de color pardo a nivel nuclear y citoplasmático sin considerar intensidad. Los campos fueron fotografiados con un microscopio *Olimpus BX41* con el programa Micrometrics SE Premium.

El parámetro de estandarización del conteo celular, fue determinar el número de células inmunopositivas por cada 1000 células epiteliales neoplásicas contadas en total utilizando el programa *Image J* para cada uno de los anticuerpos testeados. De acuerdo a este criterio se consideró positivo aquellos casos donde independientemente del número de células, hubo marcación positiva para el antígeno respectivo.

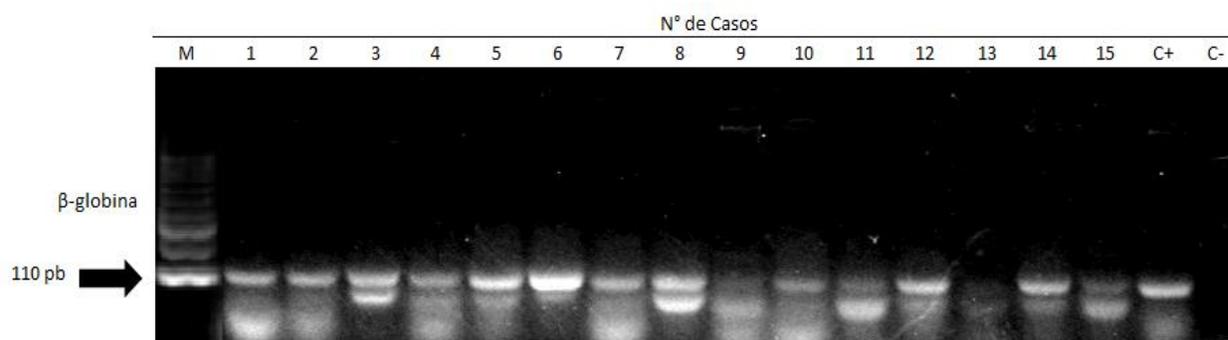
Dos observadores realizaron el recuento de las células inmunopositivas, cada uno realizó la observación completa de dos anticuerpos testeados. Se realizó una calibración intra-observador mediante coeficiente de correlación de Pearson el cual mostró un valor de 0,99. La observación de estos cortes fue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

## 4.8 VARIABLES DEL ESTUDIO

- 1. Presencia o ausencia de VPH:** COCE VPH 16/18 positivo  
COCE VPH 16/18 negativo
- 2. Recuento de células epiteliales positivas:** Se contaron hasta 1000 células epiteliales neoplásicas en total, determinando el número de células positivas para la proteína de TP53 mutado, p16, pRb y Ki-67.

## 4.9 CONTROLES DE CALIDAD

La amplificación del fragmento del gen  $\beta$ -globina con un conjunto de partidores PCO3/PCO4 (Figura 5) se utilizó como control positivo interno en todas las muestras de COCE que entraron al estudio para descartar que el ADN extraído desde el tejido fijado e incluido en parafina no fuera el adecuado para la amplificación por PCR, ya sea por fraccionamiento o degradación que sufre el ADN durante el proceso de fijación. Sólo las muestras que fueron positivas para la amplificación de  $\beta$ -globina fueron sometidas posteriormente a la detección de VPH genérico.

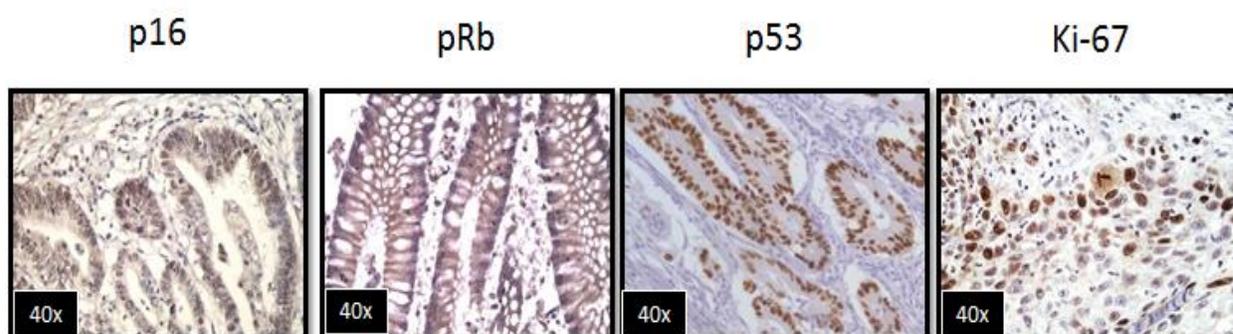


**Figura 5.** Imagen representativa de los casos estudiados. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de amplificación (PCR) de un fragmento del gen  $\beta$ -globina humana. Carriles 1-15: Ejemplos representativos de algunas muestras clínicas. M: marcador de peso molecular, C-: control negativo ( $H_2O$ ), C+: control positivo (línea celular SiHa).

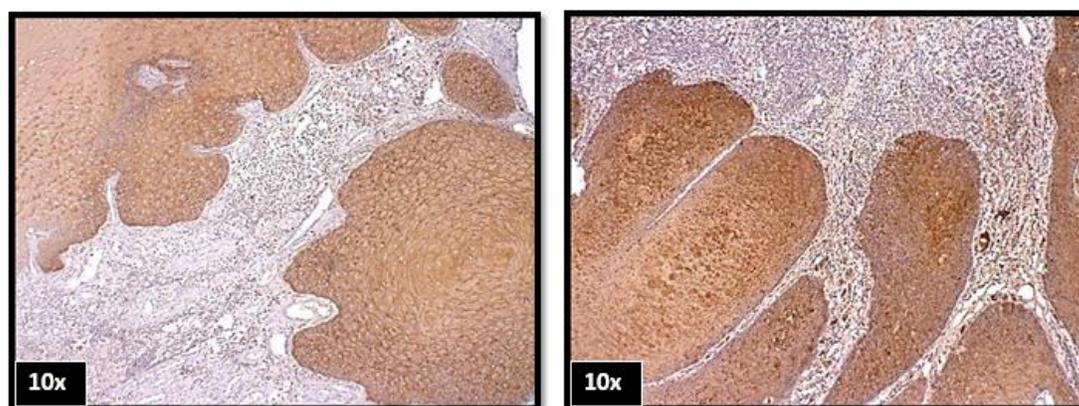
Se procedió a realizar controles positivos recomendados por el fabricante para cada uno de los anticuerpos, con el fin de validar tanto la calidad de cada anticuerpo como la técnica IHQ.

Para la demostración de los antígenos p16, p53 y Ki-67 a través de IHQ se utilizó muestras de carcinoma de colon, y para el antígeno pRb se utilizó una muestra de carcinoma de vejiga, como se muestra en la Figura 6-1.

Adicionalmente se realizó IHQ para la demostración del antígeno citoqueratina, utilizando el anticuerpo anti-pancitoqueratina AE1/AE3 en todas las muestras de COCE del estudio como control positivo interno, con el fin de descartar problemas de fijación, como se muestra en la Figura 6-2.



**Figura 6-1.** Muestras de carcinoma de colon como control positivo para p16, p53 y Ki-67 y carcinoma de vejiga para pRb. En todas las muestras se pudo observar una expresión nuclear de cada antígeno.



**Figura 6-2.** Expresión citoplasmática de citoqueratina para las muestras de COCE del estudio a través de IHQ utilizando anticuerpo anti-citoqueratina AE1/AE3.

#### **4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

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

Para determinar diferencias de género, edad y grado de diferenciación histológica entre las muestras de COCE VPH 16/18 y VPH negativas se utilizó el test exacto de Fisher.

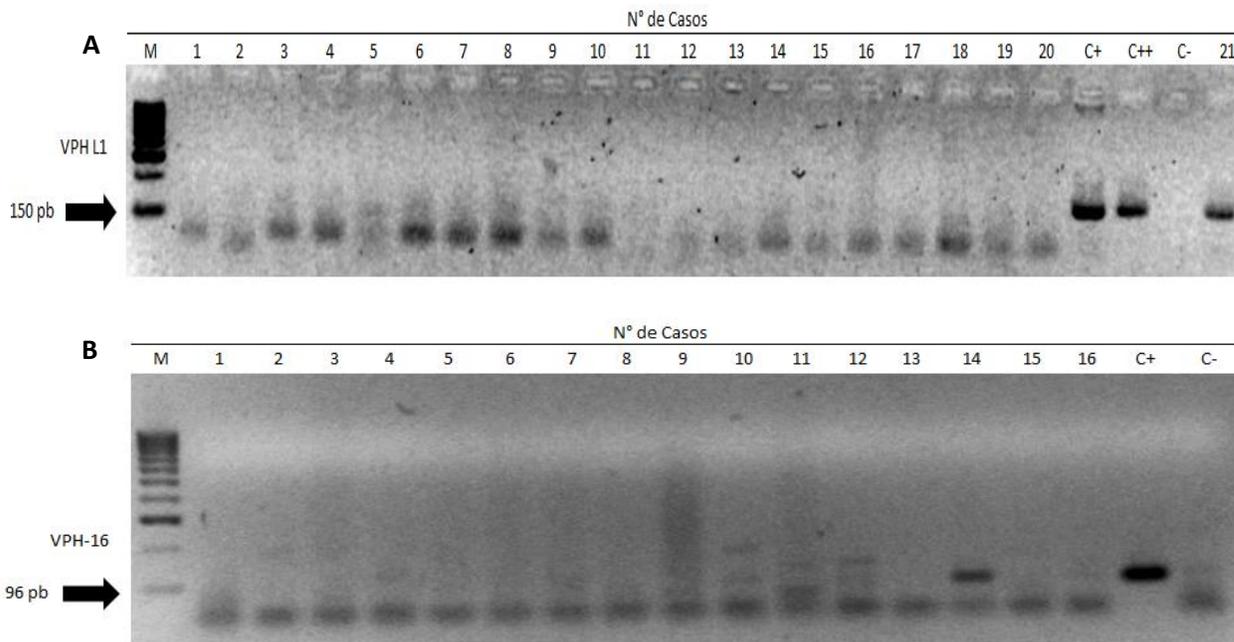
Para determinar la asociación que existía entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE, se utilizó el test de Mann-Whitney, los resultados se expresaron en mediana y rango intercuartil. Se consideró un valor de significancia menor del 5% ( $p < 0,05$ ) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el software Stata 11.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAR LA PRESENCIA DE VPH 16/18 EN COCE

De un total de 80 casos analizados a través de PCR convencional, 9 casos (11%) resultaron positivos en la detección de VPH genérico utilizando los partidores GP5+/GP6+. De estos 9 casos con presencia de VPH genérico, 8 (89%) resultaron positivos para la detección de VPH 16/18 y 1 caso fue positivo para VPH-10 (11%). De los 8 casos positivos para VPH 16/18, 5 fueron VPH-16 (63%) y 3 fueron VPH-18 (37%). Al estudiar la presencia del virus en la totalidad de los casos de COCE analizados podemos observar que el VPH 16/18 se encuentra en un 10% del total de los 80 casos de COCE, un 6% corresponde a VPH-16 y un 4% a VPH-18.

71 casos (89%) resultaron negativos para la detección de VPH genérico del total de casos estudiados (Tabla 3). En la Figura 7 se muestra una imagen representativa de los productos de PCR de los casos de COCE analizados.



**Figura 7.** Imagen representativa de los casos estudiados. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de amplificación (PCR) de un fragmento del gen L1 de VPH (A) y E6 de VPH-16 (B). A: Carriles 1-21: tejidos de COCE, M: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+, C++: controles positivos. B: Carriles 1-16: tejidos de COCE, M: marcador de peso molecular, C-: control negativo, C+: control positivo.

**Tabla 3.** Detección de VPH en las muestras de COCE

<b>VPH Genérico</b>	<b>n°</b>	<b>%</b>
Total de muestras analizadas	80	100
Casos negativos para VPH genérico	71	89
Casos positivos para VPH genérico	9	11
<b>Casos positivos para VPH genérico</b>		
Total	9	100
VPH 16/18	8	89
VPH-10	1	11
<b>Casos positivos para VPH 16/18</b>		
Total	8	100
VPH-16	5	63
VPH-18	3	37

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

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

De 80 casos analizados 1 caso resultó ser VPH-10 que correspondió a un paciente femenino de 58 años de edad, que presentó un COCE bien diferenciado.

De las restantes 79 muestras analizadas de COCE, 35 fueron mujeres, y de éstas 4 fueron positivas para VPH 16/18, lo que representa el 11% del total de mujeres de las muestras analizadas con COCE; del mismo total de muestras analizadas 44 fueron hombres, de las cuales 4 fueron VPH 16/18, lo que representa el 9% del total de hombres con COCE.

Existió la misma proporción de hombres respecto de mujeres en el total de las muestras de pacientes con COCE VPH 16/18, con un total de 4 mujeres y 4 hombres, en comparación al total de las muestras de pacientes con COCE VPH negativo en donde la proporción de hombres respecto de mujeres fue levemente mayor, con un total de 40 (91%) hombres y 31 (89%) mujeres.

La edad promedio de los pacientes con COCE VPH 16/18 fue de 64 años, similar al promedio de edad de los pacientes VPH negativo que fue de 65 años. Sólo 2 casos VPH 16/18 fueron de pacientes menores de 60 años, ambos fueron hombres.

Las muestras fueron clasificadas histológicamente según grado de diferenciación; de las 79 muestras de COCE analizadas, 49 fueron clasificadas como bien diferenciadas, de este grupo 2 muestras (4%) fueron VPH 16/18 y 47 (96%) muestras fueron VPH negativo. 27 muestras del total de casos de COCE fueron clasificadas como moderadamente diferenciadas, de las cuales 5 (19%) fueron VPH 16/18 y 22 muestras (81%) fueron VPH negativo. Del total de muestras de COCE, 3 muestras fueron clasificadas como COCE pobremente diferenciado, de las cuales 1 (33%) muestra fue VPH 16/18 y 2 muestras (67%) fueron VPH negativo.

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

	<b>Total de casos N (%)</b>	<b>VPH Negativo N (%)</b>	<b>VPH 16/18 N (%)</b>	<b>valor p*</b>
<b>Total</b>	79 (100 %)	71 (88.75%)	8 (10%)	
<b>Género</b>				
Mujer	35 (100)	31 (89)	4 (11)	0.52
Hombre	44 (100)	40 (91)	4 (9)	
<b>Edad (años)</b>				
<60	28 (100)	26 (93)	2 (7)	0.79
≥60	48 (100)	42 (87)	6 (13)	
* s/i	3 (100)	3 (100)	0 (0)	
<b>Grado de diferenciación</b>				
Bien Diferenciado	49 (100)	47 (96)	2 (4)	0.09
Moderadamente Diferenciado	27 (100)	22 (81)	5 (19)	
Pobremente Diferenciado	3 (100)	2 (67)	1 (33)	

\*s/i: sin información

En cuanto a la localización de las lesiones, fue un dato que no se pudo obtener en la gran mayoría de los casos, ya que no se encontraba esa información en las fichas clínicas. Sin embargo, la recopilación de la información sólo de los 8 casos VPH 16/18 se

puede encontrar en la Tabla 5, en donde se puede observar que la localización más frecuente de las lesiones se encuentra en igual proporción en lengua que en reborde, en dos casos no fue posible obtener esa información.

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

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

\*s/i: sin información

## **5.2 DETERMINAR EL RECuento DE CÉLULAS EPITELIALES p16, pRb, p53 Y Ki-67 POSITIVAS EN COCE**

Una vez terminada la etapa de los controles, se llevó a cabo la técnica IHQ para determinar el número de células epiteliales positivas para p16, pRb, p53 y Ki-67 en COCE y la proporción de casos positivos para cada anticuerpo testeado.

Si bien se observó tinción nuclear y/o citoplasmática del antígeno p16 a través de IHQ en los casos de COCE, sólo se consideraron como positivos aquellos casos que tuvieron tinción nuclear y citoplasmática a la vez; sólo 10 casos en total cumplieron con este criterio, 2 fueron VPH 16/18 y 8 VPH negativo (Figura 8).

La expresión nuclear del antígeno pRb a través de IHQ, se evaluó en los 79 casos de COCE del estudio, de los cuales 44 fueron positivos, de éstos 4 fueron VPH 16/18 y 40 fueron VPH negativo. No se observó positividad para pRb en 35 casos, 4 fueron VPH 16/18 y 31 VPH negativo (Figura 9).

De los 79 casos analizados de COCE, 69 fueron positivos para p53, de los cuales 7 casos fueron VPH 16/18 y 62 fueron VPH negativo. Todos los casos positivos contaron con un patrón de distribución del antígeno a nivel nuclear, como se muestra en la Figura 10.

Todos los casos analizados de COCE tanto en presencia como en ausencia del virus presentaron tinción nuclear a través de IHQ utilizando anticuerpo anti-Ki-67, como se muestra en la Figura 11, por lo cual todos fueron considerados positivos para este antígeno.

No hubo diferencias significativas en la proporción de casos positivos y negativos para p16, pRb, p53 y Ki-67 entre muestras de COCE VPH 16/18 y muestras de COCE VPH negativo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Proporción de casos positivos y negativos para p16, pRb, p53 y Ki-67 en muestras de COCE

	<b>Total de casos N (%)</b>	<b>VPH Negativo N (%)</b>	<b>VPH 16/18 N (%)</b>	<b>Valor p</b>
<b>Total</b>	79 (100 %)	71 (88.75%)	8 (10%)	
<b>Expresión nuclear y citoplasmática de la proteína p16</b>				
Casos positivos	10 (100)	8 (80)	2 (20)	0.26
Casos negativos	69 (100)	63 (91)	6 (9)	
<b>Expresión nuclear de la proteína pRb</b>				
Casos positivos	44 (100)	40 (91)	4 (9)	0.5
Casos negativos	35 (100)	31 (89)	4 (11)	
<b>Expresión nuclear de la proteína p53</b>				
Casos positivos	69 (100)	62 (90)	7 (10)	0.73
Casos negativos	10 (100)	9 (90)	1 (10)	
<b>Expresión nuclear de la proteína Ki-67</b>				
Casos positivos	79 (100)	71 (100)	8 (100)	1.0
Casos negativos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

### **5.3 RELACIONAR LA PRESENCIA DE VPH 16/18 CON EL RECUESTO DE CÉLULAS EPITELIALES p16, pRb, p53 Y Ki-67 POSITIVAS EN COCE**

Tanto en las muestras de COCE VPH 16/18 positivas y en las muestras VPH negativo ambas medianas para el recuento de células p16 positivas fue de 0. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.21$ ).

La mediana del recuento de células positivas para pRb en muestras con VPH 16/18 fue de 1.2 y para VPH negativo fue de 1.8 ( $p=0.29$ ).

En las muestras con VPH 16/18, la mediana del recuento de células positivas para p53 fue de 65.4 y la mediana para los casos VPH negativo fue de 85.4. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p= 0.77$ ).

La mediana del recuento de células positivas para Ki-67 en muestras VPH 16/18 y muestras VPH negativo, fue de 27.7 y 27 respectivamente ( $p= 0.83$ ).

No hubo diferencias significativas entre los casos de COCE con VPH 16/18 y los casos de COCE VPH negativo en el recuento de células epiteliales con expresión IHQ positiva para p16, pRb, p53 y Ki-67 (Tabla 7).

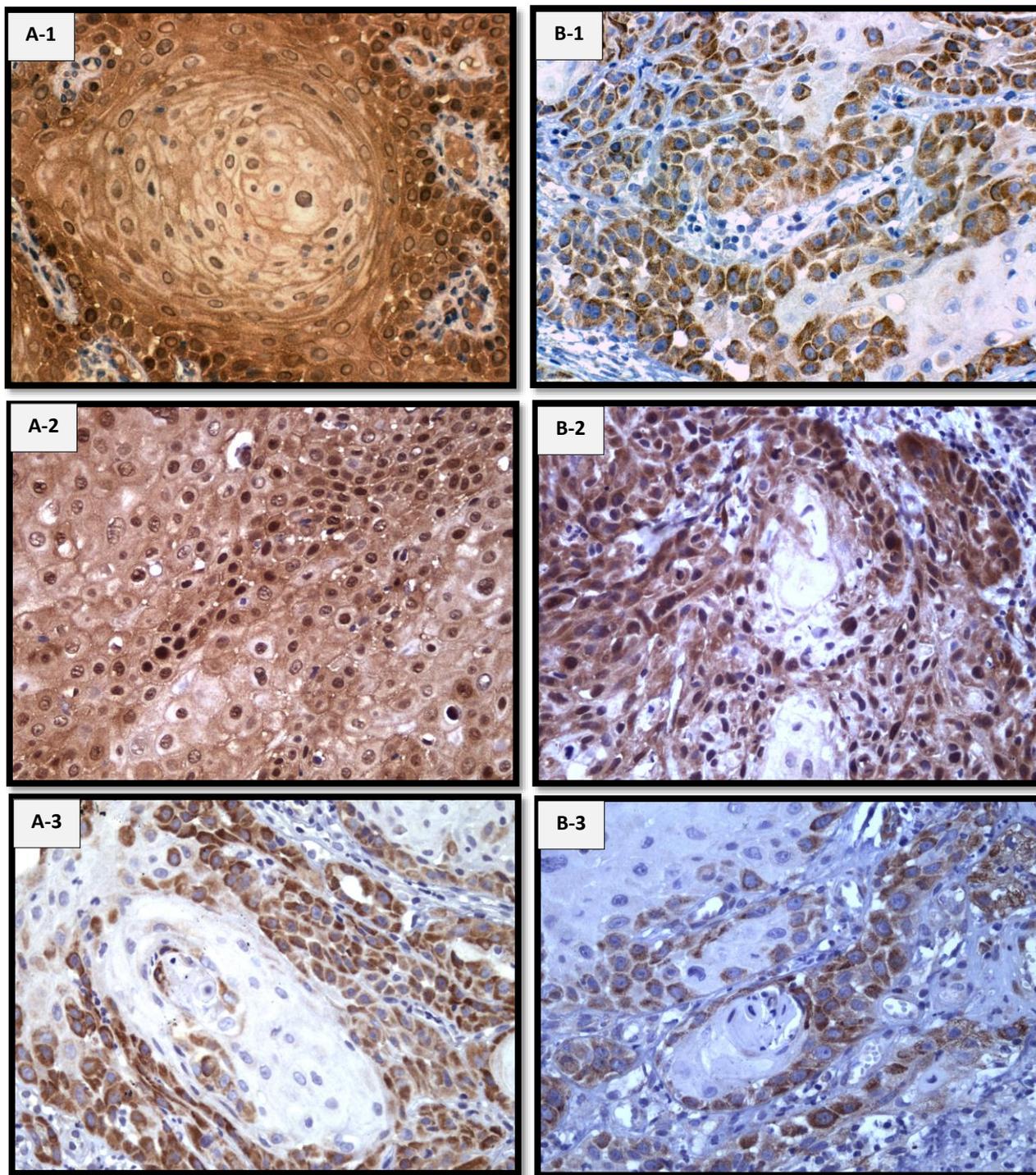
**Tabla 7.** Relación entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE.

	<b>VPH Negativo Mediana (P25-P75)</b>	<b>VPH 16/18 Mediana (P25-P75)</b>	<b>Valor p</b>
<b>Células epiteliales p16 positivas</b>	0 (0-0)	0 (0-51.7)	0.21
<b>Células epiteliales pRb positivas</b>	1.8 (0-22)	1.2 (0-2.7)	0.29
<b>Células epiteliales p53 positivas</b>	85.4 (2.2-177.6)	65.4 (11.6-144.4)	0.77
<b>Células epiteliales Ki-67 positivas</b>	27 (11.3-57.6)	27.7 (18.9-46.7)	0.83

**Evaluación IHQ para p16 en muestras de COCE VPH 16/18 y VPH negativo**

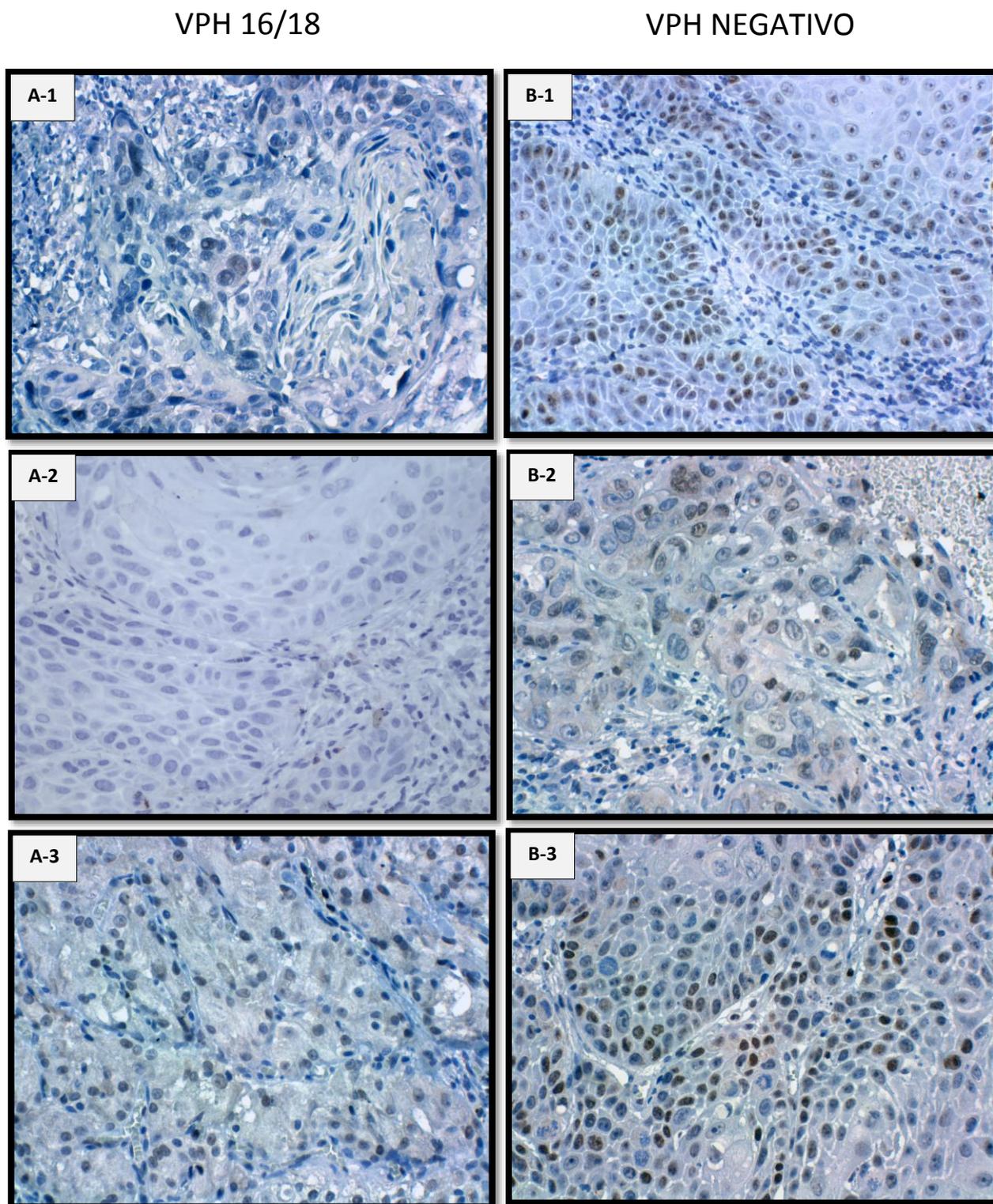
VPH 16/18

VPH NEGATIVO



**Figura 8.** Muestras de COCE VPH 16/18 y COCE VPH negativo para p16. Podemos observar que las muestra de VPH negativo la tinción es principalmente citoplasmática (B-1, B-3), también se pudo observar tinción a nivel citoplasmático y nuclear (B-2). En las imágenes A-1 y A-2 de muestras VPH 16/18 se puede observar que la tinción es nuclear y citoplasmática y en la imagen A-3 la tinción es sólo citoplasmática

## Evaluación IHQ para pRb en muestras de COCE VPH 16/18 y VPH negativo

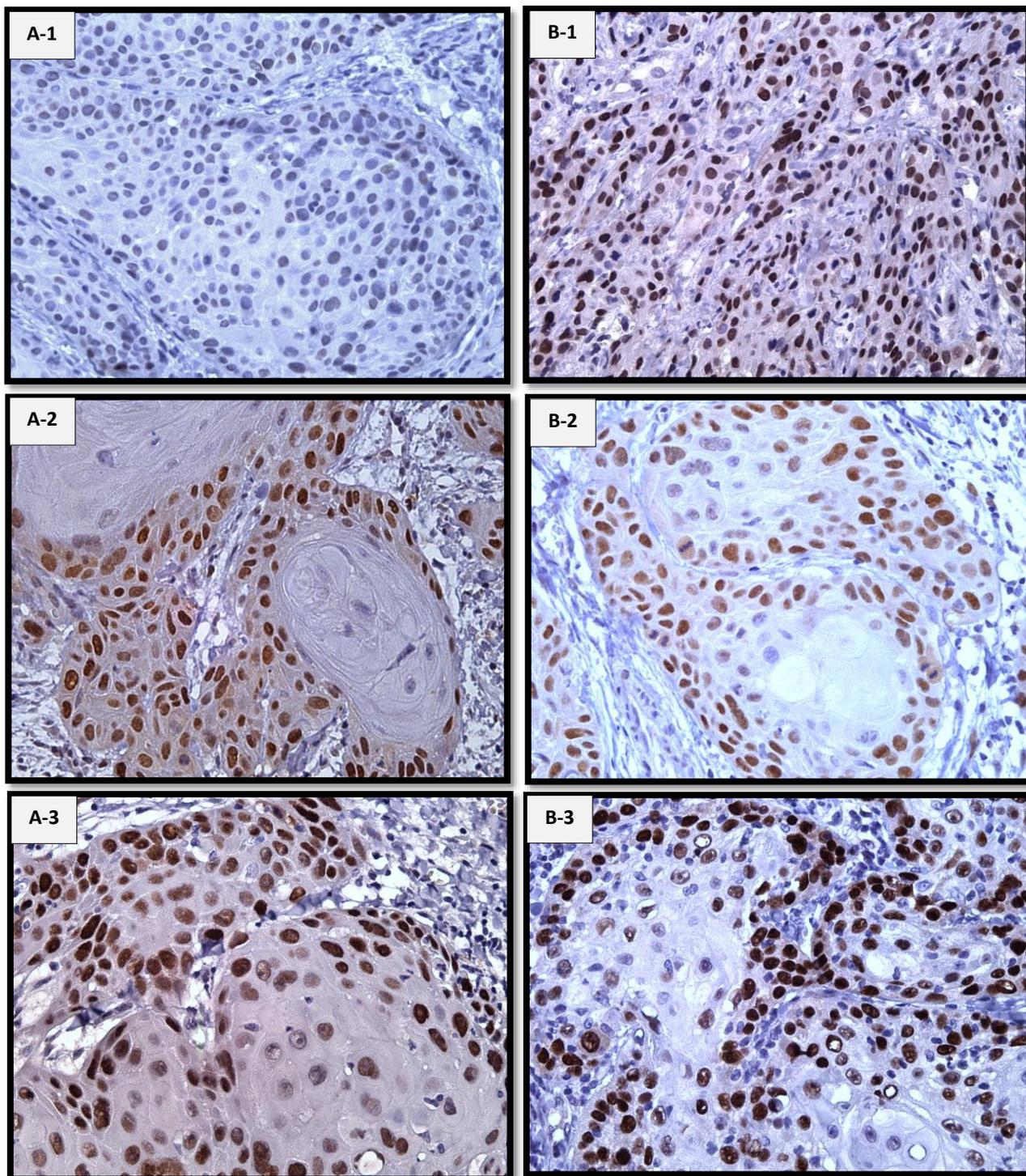


**Figura 9.** Las imágenes A-1, A-2, A-3 son muestras de COCE VPH 16/18 en las cuales se realizó técnica IHQ para la detección del antígeno nuclear pRb utilizando un anticuerpo anti-pRb. La imagen A-2 resultó negativa para la detección del antígeno en comparación con las muestras A-1 y A-3 en donde se aprecia una inmunomarcación muy leve a nivel nuclear para pRb. En las muestras de COCE VPH negativo, la presencia del antígeno se puede observar en las muestras B-1, B-2 y B-3.

**Evaluación IHQ para p53 en muestras de COCE VPH 16/18 y VPH negativo**

VPH 16/18

VPH NEGATIVO

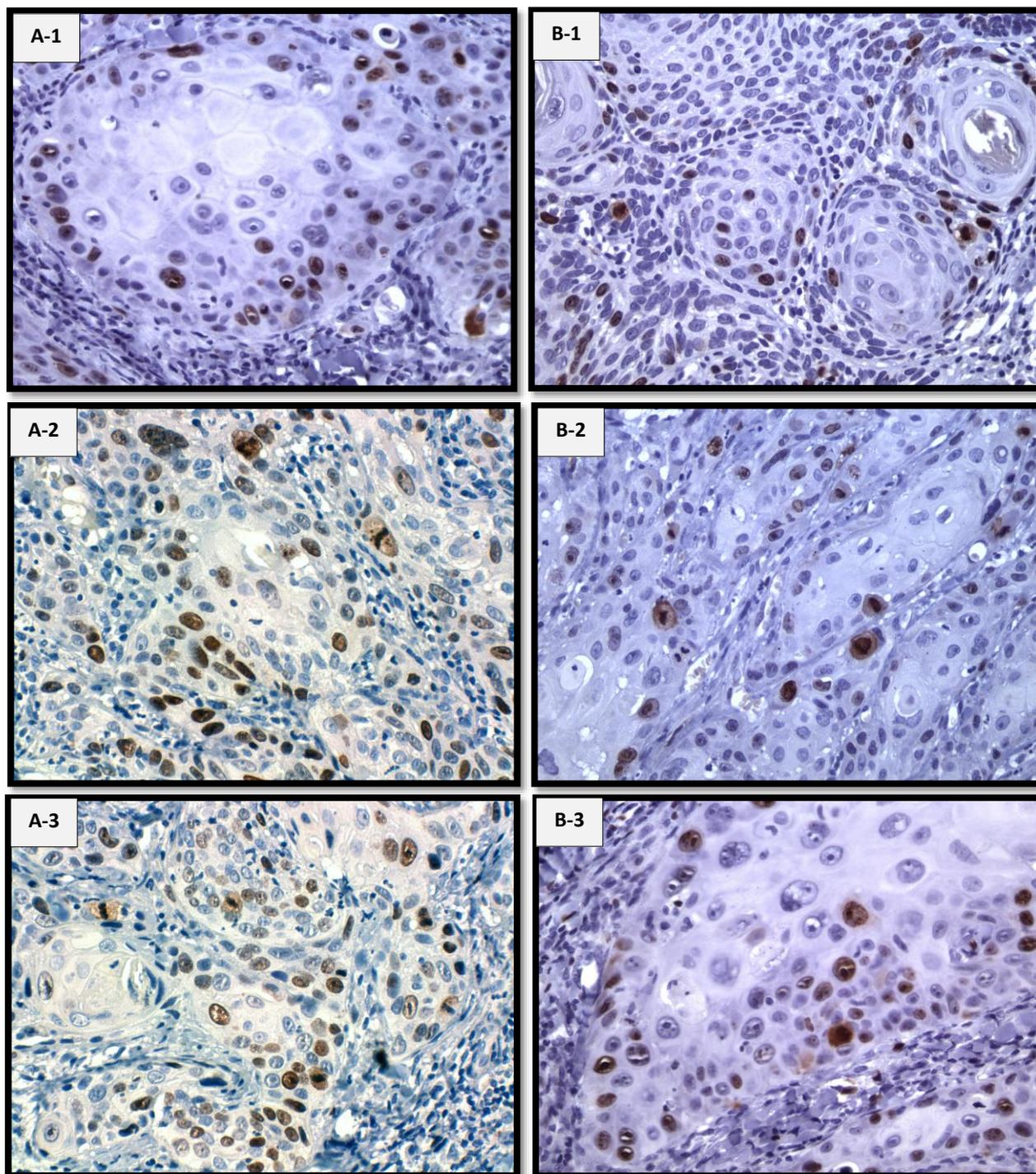


**Figura 10.** Las imágenes A-1, A-2, A-3 son muestras de COCE VPH 16/18 en las cuales se realizó técnica IHQ para la detección del antígeno nuclear p53 proveniente de la mutación de TP53 utilizando un anticuerpo anti-p53. La imagen A-1 resultó negativa para la detección del antígeno en comparación con las muestras A-2 y A-3 en donde se aprecia la inmunomarcación de color pardo a nivel nuclear para p53. En muestras de COCE VPH negativo, la presencia del antígeno a nivel nuclear se puede observar en las imágenes B-1, B-2 y B-3.

## Evaluación IHQ para Ki-67 en muestras de COCE VPH 16/18 y VPH negativo

VPH 16/18

VPH NEGATIVO



**Figura 11.** Las imágenes A-1, A-2, A-3 son muestras de COCE VPH 16/18 en las cuales se realizó técnica IHQ para la detección del antígeno nuclear Ki-67. Se observó presencia del antígeno en todas las muestras, lo mismo ocurrió con las muestras VPH negativo (B-1, B-2 y B-3), en donde la detección de Ki-67 fue positiva en todas las muestras estudiadas.

## 6. DISCUSIÓN

El COCE es el tumor maligno más frecuente de la cavidad oral cuyos factores de riesgo más conocidos son el consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo, la infección por el VPH también se ha postulado como un factor de riesgo para el desarrollo de este tumor.

El objetivo fue determinar la asociación que existe entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE.

Los resultados de este estudio mostraron que la mayoría de los casos VPH 16/18 ocurrieron en mujeres (11%), con respecto al total de la muestra analizada. No se observó significación estadística entre el género y la presencia de VPH, como tampoco en lo referente a la edad ni al grado de diferenciación histológica. Esto puede deberse al reducido número de muestras VPH positivas presentes en el estudio por lo cual es difícil establecer algún tipo de asociación. Sin embargo, lo reportado en la literatura señala que la edad media de los pacientes con cánceres asociados al VPH es menor de 60 años y las muestras suelen ser pobremente diferenciadas al examen histológico (Rautava and Syrjanen, 2012). En el presente estudio la localización más frecuente de las lesiones fue en lengua en la misma proporción que en reborde, sin embargo estos resultados no son concluyentes ya que en dos casos no fue posible obtener dicha información. En este sentido algunos estudios señalan que la lengua es la ubicación más frecuente del COCE VPH positivo e incluso puede estar relacionado con la presencia de VPH en pacientes jóvenes (da Silva et al., 2007, Salem, 2010), lo cual no pudo ser confirmado en éste estudio.

En la presente tesis, se detectó la presencia de VPH utilizando los partidores GP5+/GP6+ mediante PCR convencional. Se detectó el ADN de VPH en 9 de 80 casos estudiados (11%), de estos 9 casos, 8 (10%) resultaron ser positivos para la detección de VPH 16/18 y 1 caso resultó VPH-10. De los 8 casos positivos para VPH 16/18, 5 casos fueron VPH-16 y 3 casos fueron VPH- 18. Los resultados reportados en la literatura informan porcentajes variables de la presencia de VPH en COCE. Syrjanen et al, fueron los primeros en proponer la participación del VPH en la carcinogénesis del cáncer oral y orofaríngeo. Sus resultados mostraron que el 40% de los cánceres de laringe y cánceres orales tenían similitudes histológicas y morfológicas con lesiones infectadas por el VPH y que el 50% de las muestras expresaban proteínas asociadas a la infección viral

mediante técnicas de IHQ (Syrjanen et al., 1983). Desde entonces, varios estudios se han centrado en la detección de VPH en COCE, pero los resultados han sido contradictorios (Cruz et al., 1996, Miller and White, 1996, Zhang et al., 2004, Mirghani et al., 2014). Algunos estudios señalan que los promedios de detección de ADN del VPH en estos tumores varían desde un 0% a un 45% (Zhang et al., 2004, Nemes et al., 2006, Lingen et al., 2013, Kruger et al., 2014). St Guily et al, sostienen que la prevalencia del VPH en COCE es de un 10,5% (St Guily et al., 2011) y junto con Syrjanen et al, señalan que la prevalencia del VPH es mayor en mujeres que en hombres y que VPH-16 es el genotipo más prevalente (Syrjanen et al., 2011). Por lo tanto los resultados del presente estudio son coherentes con la literatura actual, ya que se encontró la presencia del VPH 16/18 en un 10% de los casos estudiados, en donde el genotipo más prevalente fue el 16 encontrándose en un 63% de los casos VPH positivos. Similar resultado muestra el estudio de Kreimer et al, en donde señalan que el genotipo predominante fue el VPH-16 en un 68% de las muestras de COCE VPH positivo. Sin embargo su estudio muestra una prevalencia mayor de VPH en COCE con un 23,5% (Kreimer et al., 2005).

Una muestra con VPH de bajo riesgo fue encontrada en este estudio, específicamente fue positiva para el VPH-10 y si bien no se han reportado muestras de COCE con este genotipo en particular, si se han encontrado estudios que demuestran que genotipos de VPH de bajo riesgo, particularmente VPH-6 y VPH-11 se han detectado en muestras de CCC (Kreimer et al., 2005). También es importante mencionar que según algunos estudios la presencia de VPH de bajo riesgo en pacientes con COCE podría predecir un peor pronóstico, sin embargo los mecanismos por los cuales actuaría son desconocidos (Rautava and Syrjanen, 2012, Lee et al., 2013). Debido a esto, algunos autores han sugerido que los genotipos de VPH de bajo riesgo pueden ser no del todo benignos en muestras de CCC, incluyendo la cavidad oral (Kreimer et al., 2005, Syrjanen, 2010). Nuevos focos de investigación en el futuro en este tipo de muestras sería importante para establecer algún rol del VPH de bajo riesgo en muestras de COCE.

Se ha postulado que la amplia variación en la detección de VPH en COCE depende de la población de estudio, de la ubicación de la lesión cancerosa, del tipo de muestra y especialmente del método de detección. Esto último pone de manifiesto que un problema serio en la investigación del VPH es que no existe consenso en cuanto a la manera de identificar las muestras infectadas por VPH. Son muchas las variables de análisis que

difieren entre los estudios, por lo que es difícil comparar y generalizar a partir de sus resultados.

El ADN del VPH se puede detectar por medio de varios métodos moleculares, generalmente por PCR, técnicas de hibridación in situ (HIS) o una combinación de ambos son los métodos más comúnmente utilizados para las muestras de tejido oral. La PCR es una técnica que ofrece varias ventajas sobre otros métodos ya que se requiere sólo una pequeña cantidad de material biológico para poder detectar la presencia de ADN del VPH (Sand and Jalouli, 2014), en comparación a la técnica de HIS, ya que su principal desventaja en comparación con la PCR es la baja sensibilidad, ya que requiere grandes cantidades de ADN y además tiene un mayor costo. Sin embargo, la HIS permite la detección de la infección viral en el contexto de la arquitectura celular y permite identificar solo las células tumorales que contienen genomas virales, compatible con la expansión clonal después de ocurrida la infección. La técnica de HIS es útil para confirmar los resultados de la PCR, especialmente en las muestras de tejidos embebidos en parafina, ya que en general se recomienda que al menos dos métodos normalizados y reconocidos deben ser utilizados para confirmar la infección por VPH (Lajer and von Buchwald, 2010). Si bien nuestro estudio contó con la detección de ADN de VPH a través de PCR, en futuras investigaciones de ser posible, sería apropiado confirmar nuestros resultados con técnicas de HIS.

Algunos autores sugieren que los cánceres VPH positivos y negativos representan distintos subgrupos con diferentes perfiles biológicos, epidemiológicos y sobre todo poseen diferentes factores pronósticos (Llewellyn et al., 2004, Schlecht, 2005). Estudios confirman que las muestras de CCC VPH positivas tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellas negativas (Weinberger et al., 2006, Licitra et al., 2006, Lindquist et al., 2007, Lassen, 2010). Debido a esto, se ha propuesto que el cáncer VPH positivo exhibe menos inestabilidad genética, muestra un menor grado de aneuploidía y muestra una menor tendencia a tener aberraciones cromosómicas (Dahlstrand et al., 2004). Sin embargo la exposición al hábito tabáquico parece modificar negativamente el pronóstico de los casos de cáncer VPH positivos (Ang et al., 2010).

Como se dijo anteriormente, los cánceres VPH positivos tienen diferentes perfiles biológicos, los cuales se asocian con una sobreexpresión de p16, pérdida de pRb y una disminución de p53 (Rautava and Syrjanen, 2012). Esto se fundamenta en el rol que

cumplen las proteínas E6 y E7 del VPH, las cuales son consideradas como las principales oncoproteínas que interfieren con la regulación del ciclo celular. La proteína E6 del VPH de alto riesgo se une a la proteína p53, lo que conduce a su rápida degradación a través de la vía de la ubiquitina. Por otro lado, la proteína E7 se une al gen supresor de tumores pRb e inhibe su unión a E2F (Boulet et al., 2007). El factor de transcripción E2F estimula la transcripción de p16, lo que conduce a la sobreexpresión de esta proteína, que también es causada por la pérdida de la retroalimentación negativa con pRb cuando se une a E7 del VPH. En efecto, en muestras de CCU asociado a VPH, se observa sobreexpresión de p16, pérdida de pRb y disminución de la proteína de TP53 mutado a través de la técnica IHQ (Boulet et al., 2007). Es así como Klaes et al, fueron los primeros en demostrar que la expresión de p16 mediante IHQ era una tinción específica y confiable que ayudaba a identificar células cervicales displásicas y neoplásicas infectadas por VPH (Klaes et al., 2002). Posteriormente, se observó una fuerte correlación entre la sobreexpresión de p16 y la presencia de VPH en carcinomas de células escamosas orofaríngeo y varios autores han sugerido que la sobreexpresión nuclear y citoplasmática de p16 y la pérdida de pRb a través de IHQ puede ser utilizada como un marcador sustituto de la infección por VPH (Weinberger et al., 2004, Gillespie et al., 2009, Goon et al., 2009, Lewis et al., 2010, Chen et al., 2012b).

Fundamentado en la cierta analogía y similitud con la situación encontrada tanto en CCU y cáncer orofaríngeo, se detectaron a través de IHQ las proteínas p16 y pRb, en donde se esperaba encontrar una mayor expresión de p16 y una menor expresión de pRb en los casos VPH 16/18. Sin embargo se encontraron sólo 4 casos VPH 16/18 que fueron negativos para pRb, y sólo 2 muestras tuvieron expresión nuclear y citoplasmática de p16, por lo tanto, los resultados del presente estudio hacen sugerir que la expresión de p16 y pRb son independientes a la presencia del virus, lo cual también ha sido demostrado por otros autores que señalan que la expresión de p16 no siempre es positiva en los casos COCE VPH positivos y una proporción, aunque reducida, es positiva en casos COCE VPH negativos. Por lo tanto, el presente estudio sugiere que p16 no debiera ser usado como un subrogado de infección por VPH para casos de COCE, sugerencia que es apoyada por estudios anteriores (Nemes et al., 2006, Harris et al., 2011). La evidencia sin embargo no es concluyente, pues la falta de detección de la sobreexpresión de p16 en los casos VPH positivos puede explicarse por el hecho de que p16 es

frecuentemente inactivado a través de la delección del gen CDKN2A, mutación o hipermetilación de su región promotora (Ruesga et al., 2007).

Grobe et al, en su estudio demostraron una sobreexpresión de p16 en casi el 70% de los COCE examinados, sin embargo el 80% de ellos tenía tinción IHQ predominantemente citoplasmática y sólo el 6% fueron consideradas positivas al tener tinción nuclear, los autores concluyeron que la expresión de p16 en muestras de COCE a través de técnica IHQ carece de utilidad pronóstica (Grobe et al., 2013). No cabe duda que el problema existe al momento de interpretar los resultados, ya que no existe un consenso sobre la definición de un "resultado p16-IHQ positivo" (Chen et al., 2012a, Mirghani et al., 2014), y este es un dato no menor, ya que se ha informado que existe un mejor pronóstico y una menor recurrencia local en los CCC que muestran sobreexpresión de p16, mientras que los tumores sin sobreexpresión de p16 tienen un mayor riesgo de recurrencias locales (Weinberger et al., 2004, Vairaktaris et al., 2007). Smith et al, sostuvieron que los casos de CCC VPH negativos/p16 negativos/p53 positivos tenían peor supervivencia en comparación con los casos VPH positivos/p16 positivos/p53 negativos. Cuando analizó solamente VPH-16, sus resultados sostenían que las muestras de CCC VPH-16 negativas/p16 positivas a menudo fueron consideradas como un falso negativo, ya que según el autor estas muestras podrían albergar otros genotipos de VPH, especialmente en los casos en donde la sobreexpresión de p16 se considera un sustituto de la infección por VPH y en este contexto, los pacientes VPH negativos/p16 positivos tendrían una supervivencia similar a los pacientes VPH positivos/p16 positivos (Smith et al., 2010). Similar resultado se observa en el estudio de Smeets et al, en donde demostraron que las muestras de CCC tienden a ser VPH negativas/ p16 positivas en un 15% a un 20% (Smeets et al., 2007). Esto sugiere que la expresión de p16 puede ocurrir en ausencia del VPH y no es necesariamente una consecuencia de la infección del virus y que probablemente sea debido a eventos genéticos no relacionados con la presencia del VPH o a la pérdida epigenética de pRb (Compton et al., 2011). Estos resultados nos llevan a suponer que no existe una relación directa y exclusiva entre la infección por VPH y la sobreexpresión de p16 en el desarrollo del cáncer y sugieren que los mecanismos no virales pueden desempeñar un papel en la sobreexpresión de p16, el cual no parece ser marcador sustituto de la infección por VPH en CCC. Sin embargo, los estudios se han centrado en cánceres orofaríngeos debido principalmente a pequeño número de casos

de COCE. Por lo tanto, la utilidad de p16 como un marcador sustituto para la infección de VPH o como marcador pronóstico se limita hasta el momento a cánceres orofaríngeos. A pesar de esto, los resultados de este estudio avalan los reportes mencionados, ya que se encontraron 8 muestras VPH negativas/p16 positivas y sólo 2 muestras VPH positivas/p16 positivas. Por lo tanto futuros estudios de la expresión p16 en muestras de COCE son necesarios para establecer su rol en este tipo de tumores.

La tinción IHQ para p53 se ha aplicado como un marcador sustituto de la mutación de TP53 (Braakhuis et al., 2014). En este estudio se encontró expresión IHQ para p53 en un alto porcentaje de las muestras evaluadas, sin embargo la expresión de esta proteína fue independiente a la presencia de VPH. Nemes et al, en su estudio demostraron que no hay diferencias en la expresión de p53 en COCE independiente de la presencia de VPH (Nemes et al., 2006). Por otra parte, Shuyama et al, en su estudio tampoco encontraron un asociación entre la presencia VPH con la expresión de p16 y p53 en muestras de carcinoma de células escamosas del esófago (Shuyama et al., 2007).

Ki-67 es considerado un marcador de proliferación celular y es por esto que fue utilizado para comparar su expresión en presencia o ausencia del VPH 16/18, ya que al parecer el virus promueve alteraciones directas sobre mitosis y progresión del ciclo celular, lo cual se puede estimar por un mayor índice de proliferación celular (Mimica et al., 2010, Freudlsperger et al., 2012). No existen estudios que asocien la presencia de VPH 16/18 en muestras de COCE con el grado de proliferación a través de Ki-67. Sin embargo el presente estudio no logró identificar diferencias significativas entre las muestras VPH 16/18 y las muestras VPH negativo, ya que la presencia de la proteína fue de un 100% en ambos grupos de estudio.

Por todo lo expuesto anteriormente se puede concluir en base a los resultados de este estudio que la expresión de p16, pRb, p53 y Ki-67 en células epiteliales en COCE, sería independiente a la presencia de VPH 16/18. Sin embargo es importante ampliar no sólo el número de muestras analizadas, sino que es necesario que exista un consenso con respecto a los métodos para la detección de VPH que puedan validar los datos obtenidos, así como también, obtener información sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH, del estado de integración del virus por medio de la pérdida de E2 y del estado de metilación de p16, todos los cuales son futuros retos para poder completar estos resultados ya que recordemos que la presencia de ADN del VPH por sí sola no es

suficiente evidencia de una asociación causal. Sería también interesante ampliar la gama de marcadores a través de IHQ de proteínas implicadas en la infección por VPH, y así poder contribuir en el futuro a que la investigación en cánceres VPH positivos pueda ampliar nuestra comprensión sobre el rol etiopatogénico del VPH en COCE.

## **7. CONCLUSIONES**

- 1) La prevalencia del VPH 16/18 en muestras de COCE fue de un 10%, similar a lo reportado en la literatura
- 2) De acuerdo a los resultados de este estudio el VPH-16 es el genotipo más prevalente en muestras de COCE VPH positivas
- 3) No se encontró un mayor recuento de células epiteliales Ki-67 y p16 positivas en COCE VPH 16/18 en comparación a COCE VPH 16/18 negativos.
- 4) No se encontró menor recuento de células epiteliales pRb y p53 positivas en COCE VPH 16/18 en comparación a COCE VPH 16/18 negativos.
- 5) No se encontró asociación entre la presencia de VPH16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE.
- 6) De acuerdo a los resultados del presente estudio, la detección de p16 a través de IHQ no se comporta como un marcador sustituto de la infección por VPH.

## **8. PERSPECTIVAS**

- 1) La presencia de ADN del VPH por sí sola no constituye un factor que permita determinar causalidad en carcinogénesis. Por lo tanto es importante ampliar el estudio y determinar tanto la expresión de las oncoproteínas E6/E7, el estado de E2 y el estado de metilación de p16 de las muestras analizadas.
- 2) La recopilación de los datos demográficos de los pacientes, así como también datos del consumo de tabaco y alcohol en estudios retrospectivos es difícil, ya que las fichas clínicas de los pacientes en la gran mayoría de los casos están incompletas. De allí la importancia de poder realizar estudios prospectivos que incluyan fichas clínicas con todos los datos de los pacientes para poder

realizar estudios de seguimiento y así poder establecer algún factor pronóstico en las muestras analizadas.

## **9. FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO**

Nuestro estudio contó con aporte económico del proyecto *FONDECYT N°1120248*, “Función de las oncoproteínas E6 y E7 de virus papiloma humano (HPV) tipo 16 en carcinogénesis asociada a humo del tabaco: Interacción entre componentes del humo del cigarrillo y las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales orales y bronquiales y especímenes clínicos” cuyo investigador responsable es el Dr. Francisco Aguayo y co-investigador el Dr. Gonzalo Rojas.

## **10. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este trabajo formó parte del Proyecto *FONDECYT N°1120248*, “Función de las oncoproteínas E6 y E7 de virus papiloma humano (HPV) tipo 16 en carcinogénesis asociada a humo del tabaco: Interacción entre componentes del humo del cigarrillo y las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales orales y bronquiales y especímenes clínicos” cuyo investigador responsable es el Dr. Francisco Aguayo perteneciente al programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ANEXO 1).

## 11. RESUMEN

El virus papiloma humano (VPH), es el agente causal de cánceres de la región anogenital. Hasta la fecha se ha encontrado asociación entre la presencia del VPH y el desarrollo de un subconjunto de cánceres de la región orofaringe. Sin embargo, existe controversia de la participación del virus en el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) y de su rol oncogénico. El objetivo de este estudio fue determinar una eventual asociación entre la presencia de VPH 16/18 y el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE.

Estudio observacional analítico de corte transversal. Se seleccionaron 80 casos de COCE registrados en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y del Instituto Nacional del Cáncer. La presencia de VPH fue detectada a través de PCR convencional y la detección de p16, pRb, p53 y Ki-67 mediante inmunohistoquímica. Se contabilizó el número de células positivas por cada 1000 células epiteliales utilizando el software Image J. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Stata 11.0.

De un total de 80 casos analizados, 9 casos (11%) resultaron positivos en la detección de VPH genérico utilizando los partidores GP5+/GP6+, de estos 9 casos, 8 (10%) resultaron ser positivos para la detección de VPH 16/18 y 1 caso resultó positivo para VPH-10. De los 8 casos positivos para VPH 16/18, 5 fueron VPH-16 y 3 fueron VPH-18. 71 casos resultaron negativos para la detección de VPH genérico.

La prevalencia del VPH 16/18 en muestras de COCE fue similar a lo reportado en la literatura. El VPH-16 fue el genotipo más prevalente en muestras de COCE VPH positivas. No hubo asociación entre la presencia de VPH 16/18 con el recuento de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE.

Según nuestros resultados la expresión de células epiteliales p16, pRb, p53 y Ki-67 positivas en COCE, sería independiente a la presencia de VPH 16/18. La detección de p16 a través de IHQ no se comporta como un marcador sustituto de la infección por VPH.

*Palabras claves:* Carcinoma oral de células escamosas, virus papiloma humano, p16, pRb, p53 y Ki-67

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, A. L., Souza, R. P., Gimenes, F. & Consolaro, M. E. (2012) A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology* **9**, 262. doi:10.1186/1743-422x-9-262.
- Aguayo, F., Castillo, A., Koriyama, C., Higashi, M., Itoh, T., Capetillo, M., Shuyama, K., Corvalan, A., Eizuru, Y. & Akiba, S. (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* **97**, 85-91. doi:10.1038/sj.bjc.6603848.
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P. & Gillison, M. L. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **363**, 24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217.
- Bernard, H. U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S1-6. doi:10.1016/j.jcv.2004.10.021.
- Bodily, J. & Laimins, L. A. (2011) Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* **19**, 33-39. doi:10.1016/j.tim.2010.10.002.
- Boulet, G., Horvath, C., Vanden Broeck, D., Sahebali, S. & Bogers, J. (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 2006-2011. doi:10.1016/j.biocel.2007.07.004.
- Braakhuis, B. J., Rietbergen, M. M., Buijze, M., Snijders, P. J., Bloemena, E., Brakenhoff, R. H. & Leemans, C. R. (2014) TP53 mutation and human papilloma virus status of oral squamous cell carcinomas in young adult patients. *Oral Dis* **20**, 602-608. doi:10.1111/odi.12178.
- Cambuzzi, E., Zettler, C. G. & Alexandre, C. O. (2005) Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* **11**, 114-120. doi:Paor.2005.11.2.0114.
- Campisi, G. & Giovannelli, L. (2009) Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol* **1**, 8. doi:10.1186/1758-3284-1-8.
- Campisi, G., Panzarella, V., Giuliani, M., Lajolo, C., Di Fede, O., Falaschini, S., Di Liberto, C., Scully, C. & Lo Muzio, L. (2007) Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* **30**, 813-823.
- Chakrabarti, O. & Krishna, S. (2003) Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* **28**, 337-348.
- Chen, Y. W., Kao, S. Y. & Yang, M. H. (2012a) Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel quid consumption. *J Surg Oncol* **106**, 149-154. doi:10.1002/jso.23067.
- Chen, Z. W., Weinreb, I., Kamel-Reid, S. & Perez-Ordóñez, B. (2012b) Equivocal p16 immunostaining in squamous cell carcinoma of the head and neck: staining patterns are suggestive of HPV status. *Head Neck Pathol* **6**, 422-429. doi:10.1007/s12105-012-0382-3.

- Chow, L. T., Broker, T. R. & Steinberg, B. M. (2010) The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis* **118**, 422-449. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x.
- Compton, A. M., Moore-Medlin, T., Herman-Ferdinandez, L., Clark, C., Caldito, G. C., Wang, X. I., Thomas, J., Abreo, F. W. & Nathan, C. O. (2011) Human papillomavirus in metastatic lymph nodes from unknown primary head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* **145**, 51-57. doi:10.1177/0194599811400385.
- Cruz, I. B., Snijders, P. J., Steenberg, R. D., Meijer, C. J., Snow, G. B., Walboomers, J. M. & van der Waal, I. (1996) Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **32b**, 55-62.
- D'Souza, G., Zhang, H. H., D'Souza, W. D., Meyer, R. R. & Gillison, M. L. (2010) Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer. *Oral Oncol* **46**, 100-104. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.11.004.
- da Silva, C. E., da Silva, I. D., Cerri, A. & Weckx, L. L. (2007) Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **104**, 497-500. doi:10.1016/j.tripleo.2007.04.028.
- Dahlstrand, H., Dahlgren, L., Lindquist, D., Munck-Wikland, E. & Dalianis, T. (2004) Presence of human papillomavirus in tonsillar cancer is a favourable prognostic factor for clinical outcome. *Anticancer Res* **24**, 1829-1835.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. & Stanley, M. A. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **30 Suppl 5**, F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.
- Dragomir, L. P., Simionescu, C., Margaritescu, C., Stepan, A., Dragomir, I. M. & Popescu, M. R. (2012) P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* **53**, 89-93.
- Francis, G., Dileep Kumar, U., Nalinakumari, K. R., Jayasree, K. & Kannan, S. (2013) Accumulation of inactive p53 protein in oral squamous cell carcinoma: stabilization by protein interaction. *Eur J Oral Sci* **121**, 21-28. doi:10.1111/eos.12007.
- Freudlsperger, C., Freier, K., Hoffmann, J. & Engel, M. (2012) Ki-67 expression predicts radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **41**, 965-969. doi:10.1016/j.ijom.2012.04.014.
- Fronie, A., Bunget, A., Afrem, E., Preotescu, L. L., Corlan Puscu, D., Streba, L., Mogoanta, L. & Dumitrescu, D. (2013) Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* **54**, 343-348.
- Gillespie, M. B., Rubinchik, S., Hoel, B. & Sutkowski, N. (2009) Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Curr Treat Options Oncol* **10**, 296-307. doi:10.1007/s11864-009-0113-5.
- Gillison, M. L. (2004) Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* **31**, 744-754.
- Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S. & Viscidi, R. (2008) Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and

- human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **100**, 407-420. doi:10.1093/jnci/djn025.
- Gonzalez-Moles, M. A., Ruiz-Avila, I., Gil-Montoya, J. A., Esteban, F. & Bravo, M. (2010) Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol* **46**, 525-530. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.020.
- Goon, P. K., Stanley, M. A., Ebmeyer, J., Steinstrasser, L., Upile, T., Jerjes, W., Bernal-Sprekelsen, M., Gorner, M. & Sudhoff, H. H. (2009) HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol* **1**, 36. doi:10.1186/1758-3284-1-36.
- Grobe, A., Hanken, H., Kluwe, L., Schollchen, M., Tribius, S., Pohlenz, P., Clauditz, T., Grob, T., Simon, R., Sauter, G., Heiland, M. & Blessmann, M. (2013) Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **42**, 676-681. doi:10.1111/jop.12086.
- Ha, P. K. & Califano, J. A. (2004) The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 188-196.
- Hafkamp, H. C., Speel, E. J., Haesevoets, A., Bot, F. J., Dinjens, W. N., Ramaekers, F. C., Hopman, A. H. & Manni, J. J. (2003) A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* **107**, 394-400. doi:10.1002/ijc.11389.
- Hahn, W. C. & Weinberg, R. A. (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 331-341. doi:10.1038/nrc795.
- Harris, S. L., Thorne, L. B., Seaman, W. T., Hayes, D. N., Couch, M. E. & Kimple, R. J. (2011) Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* **33**, 1622-1627. doi:10.1002/hed.21650.
- Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M. J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F. X., Reidel, U., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Viscidi, R., Munoz, N. & Franceschi, S. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1772-1783.
- Hoffmann, M., Ihloff, A. S., Gorogh, T., Weise, J. B., Fazel, A., Krams, M., Rittgen, W., Schwarz, E. & Kahn, T. (2010) p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* **127**, 1595-1602. doi:10.1002/ijc.25174.
- Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O. & Bogers, J. P. (2010) Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* **7**, 11. doi:10.1186/1743-422x-7-11.
- Huang Liu, R., Chen, S. P., Lu, T. M., Tsai, W. Y., Tsai, C. H., Yang, C. C. & Tzeng, Y. M. (2014) Selective apoptotic cell death effects of oral cancer cells treated with destruxin B. *BMC Complement Altern Med* **14**, 207. doi:10.1186/1472-6882-14-207.
- Hwang, Y. & Lee, M. (2012) Comparison of the AdvanSure human papillomavirus screening real-time PCR, the Abbott RealTime High Risk human papillomavirus test, and the Hybrid Capture human papillomavirus DNA test for the detection of human papillomavirus. *Ann Lab Med* **32**, 201-205. doi:10.3343/alm.2012.32.3.201.

- Jayasurya, R., Sathyan, K. M., Lakshminarayanan, K., Abraham, T., Nalinakumari, K. R., Abraham, E. K., Nair, M. K. & Kannan, S. (2005) Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol* **18**, 1056-1066. doi:10.1038/modpathol.3800387.
- Jordan, R. C., Lingen, M. W., Perez-Ordóñez, B., He, X., Pickard, R., Koluder, M., Jiang, B., Wakely, P., Xiao, W. & Gillison, M. L. (2012) Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* **36**, 945-954. doi:10.1097/PAS.0b013e318253a2d1.
- Jung, A. C., Briolat, J., Millon, R., de Reynies, A., Rickman, D., Thomas, E., Abecassis, J., Clavel, C. & Wasylyk, B. (2010) Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **126**, 1882-1894. doi:10.1002/ijc.24911.
- Keating, J. T., Cviko, A., Riethdorf, S., Riethdorf, L., Quade, B. J., Sun, D., Duensing, S., Sheets, E. E., Munger, K. & Crum, C. P. (2001) Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* **25**, 884-891.
- Klaes, R., Benner, A., Friedrich, T., Ridder, R., Herrington, S., Jenkins, D., Kurman, R. J., Schmidt, D., Stoler, M. & von Knebel Doeberitz, M. (2002) p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* **26**, 1389-1399.
- Klussmann, J. P., Gultekin, E., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Dienes, H. P., Eckel, H. E., Pfister, H. J. & Fuchs, P. G. (2003) Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* **162**, 747-753. doi:10.1016/s0002-9440(10)63871-0.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P. & Franceschi, S. (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 467-475. doi:10.1158/1055-9965.epi-04-0551.
- Kruger, M., Pabst, A. M., Walter, C., Sagheb, K., Gunther, C., Blatt, S., Weise, K., Al-Nawas, B. & Ziebart, T. (2014) The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: A retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *J Craniomaxillofac Surg*. doi:10.1016/j.jcms.2014.04.022.
- Kumar, B., Cordell, K. G., Lee, J. S., Worden, F. P., Prince, M. E., Tran, H. H., Wolf, G. T., Urba, S. G., Chepeha, D. B., Teknos, T. N., Eisbruch, A., Tsien, C. I., Taylor, J. M., D'Silva, N. J., Yang, K., Kurnit, D. M., Bauer, J. A., Bradford, C. R. & Carey, T. E. (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* **26**, 3128-3137. doi:10.1200/jco.2007.12.7662.
- Kurokawa, H., Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tanaka, T., Tomoyose, T., Takano, H., Funaki, K., Fukuyama, H., Takahashi, T. & Sakoda, S. (2005) The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **34**, 602-607. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00358.x.
- Lajer, C. B. & von Buchwald, C. (2010) The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *Apmis* **118**, 510-519. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02624.x.
- Lassen, P. (2010) The role of Human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. *Radiother Oncol* **95**, 371-380. doi:10.1016/j.radonc.2010.04.022.

- Lassen, P., Eriksen, J. G., Hamilton-Dutoit, S., Tramm, T., Alsner, J. & Overgaard, J. (2009) Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **27**, 1992-1998. doi:10.1200/jco.2008.20.2853.
- Lee, L. A., Huang, C. G., Tsao, K. C., Liao, C. T., Kang, C. J., Chang, K. P., Huang, S. F., Chen, I. H., Fang, T. J., Li, H. Y., Yang, S. L., Lee, L. Y., Hsueh, C., Chen, T. C., Lin, C. Y., Fan, K. H., Wang, H. M., Ng, S. H., Chang, Y. L., Lai, C. H., Shih, S. R. & Yen, T. C. (2013) Increasing rates of low-risk human papillomavirus infections in patients with oral cavity squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes. *J Clin Virol* **57**, 331-337. doi:10.1016/j.jcv.2013.04.010.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. & Brakenhoff, R. H. (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 9-22. doi:10.1038/nrc2982.
- Lewis, J. S., Jr., Thorstad, W. L., Chernock, R. D., Haughey, B. H., Yip, J. H., Zhang, Q. & El-Mofty, S. K. (2010) p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* **34**, 1088-1096. doi:10.1097/PAS.0b013e3181e84652.
- Licitra, L., Perrone, F., Bossi, P., Suardi, S., Mariani, L., Artusi, R., Oggionni, M., Rossini, C., Cantu, G., Squadrelli, M., Quattrone, P., Locati, L. D., Bergamini, C., Olmi, P., Pierotti, M. A. & Pilotti, S. (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* **24**, 5630-5636. doi:10.1200/jco.2005.04.6136.
- Lindquist, D., Romanitan, M., Hammarstedt, L., Nasman, A., Dahlstrand, H., Lindholm, J., Onelov, L., Ramqvist, T., Ye, W., Munck-Wikland, E. & Dalianis, T. (2007) Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol* **1**, 350-355. doi:10.1016/j.molonc.2007.08.005.
- Lingen, M. W., Xiao, W., Schmitt, A., Jiang, B., Pickard, R., Kreinbrink, P., Perez-Ordenez, B., Jordan, R. C. & Gillison, M. L. (2013) Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* **49**, 1-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.07.002.
- Llewellyn, C. D., Johnson, N. W. & Warnakulasuriya, K. A. (2004) Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* **33**, 525-532. doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00222.x.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874-7887. doi:10.1038/sj.onc.1204869.
- McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. (2013) Biochemical and functional interactions of human papillomavirus proteins with polycomb group proteins. *Viruses* **5**, 1231-1249. doi:10.3390/v5051231.
- Mellin, H., Dahlgren, L., Munck-Wikland, E., Lindholm, J., Rabbani, H., Kalantari, M. & Dalianis, T. (2002) Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* **102**, 152-158. doi:10.1002/ijc.10669.
- Miller, C. S. & Johnstone, B. M. (2001) Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**, 622-635. doi:10.1067/moe.2001.115392.

- Miller, C. S. & White, D. K. (1996) Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **82**, 57-68.
- Mimica, M., Tomic, S., Kardum, G., Hofman, I. D., Kaliterna, V. & Pejkovic, L. (2010) Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer* **20**, 116-119. doi:10.1111/IGC.0b013e3181bc8da7.
- Mirghani, H., Amen, F., Moreau, F., Guigay, J., Ferchiou, M., Melkane, A. E., Hartl, D. M. & Lacau St Guily, J. (2014) Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol* **50**, 1-9. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.10.008.
- Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M. & Zacny, V. L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**, 7888-7898. doi:10.1038/sj.onc.1204860.
- Munger, K. & Howley, P. M. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* **89**, 213-228.
- Nemes, J. A., Deli, L., Nemes, Z. & Marton, I. J. (2006) Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**, 344-352. doi:10.1016/j.tripleo.2005.10.069.
- Neville, B. W. & Day, T. A. (2002) Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* **52**, 195-215.
- Nylander, K., Dabelsteen, E. & Hall, P. A. (2000) The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* **29**, 413-425.
- Oh, J. E., Kim, J. O., Shin, J. Y., Zhang, X. H., Won, H. S., Chun, S. H., Jung, C. K., Park, W. S., Nam, S. W., Eun, J. W. & Kang, J. H. (2013) Molecular genetic characterization of p53 mutated oropharyngeal squamous cell carcinoma cells transformed with human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Int J Oncol* **43**, 383-393. doi:10.3892/ijo.2013.1953.
- Pannone, G., Santoro, A., Papagerakis, S., Lo Muzio, L., De Rosa, G. & Bufo, P. (2011) The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer* **6**, 4. doi:10.1186/1750-9378-6-4.
- Rautava, J. & Syrjanen, S. (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* **6 Suppl 1**, S3-15. doi:10.1007/s12105-012-0367-2.
- Riera, P. & Martinez, B. (2005) [Morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in Chile]. *Rev Med Chil* **133**, 555-563. doi:/S0034-98872005000500007.
- Rojas-Alcayaga, G., Brignardello, R., Espinoza, I., Franco, M. E., Lobos, N. & Ortega-Pinto, A. V. (2010) Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile. *Acta Odontol Latinoam* **23**, 136-142.
- Ruesga, M. T., Acha-Sagredo, A., Rodriguez, M. J., Aguirregaviria, J. I., Videgain, J., Rodriguez, C., de Pancorbo Mde, L. & Aguirre, J. M. (2007) p16(INK4a) promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. *Cancer Lett* **250**, 140-145. doi:10.1016/j.canlet.2006.10.001.
- Salem, A. (2010) Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. *Ann Oncol* **21**, 13-17. doi:10.1093/annonc/mdp380.

- Sand, L. & Jalouli, J. (2014) Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect* **16**, 371-378. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.009.
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **370**, 890-907. doi:10.1016/s0140-6736(07)61416-0.
- Schlecht, N. F. (2005) Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. *Oncol Rep* **14**, 1239-1247.
- Shuyama, K., Castillo, A., Aguayo, F., Sun, Q., Khan, N., Koriyama, C. & Akiba, S. (2007) Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China. *Br J Cancer* **96**, 1554-1559. doi:10.1038/sj.bjc.6603765.
- Smeets, S. J., Hesselink, A. T., Speel, E. J., Haesevoets, A., Snijders, P. J., Pawlita, M., Meijer, C. J., Braakhuis, B. J., Leemans, C. R. & Brakenhoff, R. H. (2007) A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* **121**, 2465-2472. doi:10.1002/ijc.22980.
- Smith, E. M., Rubenstein, L. M., Hoffman, H., Haugen, T. H. & Turek, L. P. (2010) Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer* **5**, 4. doi:10.1186/1750-9378-5-4.
- Soussi, T. (2007) p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* **26**, 2145-2156. doi:10.1038/sj.onc.1210280.
- St Guily, J. L., Jacquard, A. C., Pretet, J. L., Haesebaert, J., Beby-Defaux, A., Clavel, C., Agius, G., Birembaut, P., Okais, C., Leocmach, Y., Soubeyrand, B., Pradat, P., Riethmuller, D., Mouglin, C. & Denis, F. (2011) Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol* **51**, 100-104. doi:10.1016/j.jcv.2011.03.003.
- Syrjanen, K. J., Pyrhonen, S., Syrjanen, S. M. & Lamberg, M. A. (1983) Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* **21**, 147-153.
- Syrjanen, S. (2010) The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* **21 Suppl 7**, vii243-245. doi:10.1093/annonc/mdq454.
- Syrjanen, S., Lodi, G., von Bultzingslowen, I., Aliko, A., Arduino, P., Campisi, G., Challacombe, S., Ficarra, G., Flaitz, C., Zhou, H. M., Maeda, H., Miller, C. & Jontell, M. (2011) Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* **17 Suppl 1**, 58-72. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x.
- Thierry, F. (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* **384**, 375-379. doi:10.1016/j.virol.2008.11.014.
- Thomas, J. & Primeaux, T. (2012) Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol* **16**, 91-99. doi:10.1016/j.anndiagnpath.2011.09.002.
- Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. (1999) The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690-7700. doi:10.1038/sj.onc.1202953.
- Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Psyrris, A., Spyridonidou, S., Yannopoulos, A., Lazaris, A., Vassiliou, S., Ferekidis, E., Vylliotis, A., Nkenke, E. & Patsouris, E. (2007) Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res* **27**, 979-984.

- Vousden, K. H. & Prives, C. (2005) P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* **120**, 7-10. doi:10.1016/j.cell.2004.12.027.
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R. L., Rimm, D. L. & Psyrrri, A. (2006) Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* **24**, 736-747. doi:10.1200/jco.2004.00.3335.
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Sasaki, C., Rimm, D. L. & Psyrrri, A. (2004) Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 5684-5691. doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-0448.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Castle, P. E., Edelstein, Z. R., Meyers, C., Ho, J. & Schiffman, M. (2009) Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 3490-3496. doi:10.1158/1055-9965.epi-09-0763.
- Yugawa, T. & Kiyono, T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* **19**, 97-113. doi:10.1002/rmv.605.
- Zhang, Z. Y., Sdek, P., Cao, J. & Chen, W. T. (2004) Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**, 71-74. doi:10.1054/ijom.2002.0443.
- zur Hausen, H. (2009) Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J Med Res* **130**, 209.

13. ANEXO 1

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

1/2



**ACTA DE APROBACIÓN**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

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

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

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

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

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

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

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



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



2/2

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

26 ABO. 2011

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

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

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

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

Santiago, 26 de agosto de 2011.



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

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

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



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

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

#### 1. INTRODUCCION

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

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

2

26 AGO. 2011



## 2. PROCEDIMIENTOS

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

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

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

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

## 3. BENEFICIOS

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

## 4. RIESGOS

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

3

**5. COSTOS**

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



26 AGO 2011

**6. CONFIDENCIALIDAD**

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

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

**7. DERECHOS**

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

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

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

**8. CONTACTOS**

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

HPV cancer pulmonar/FAG

4

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



26 AGO. 2011

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

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

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

si acepto / no acepto participar en esta investigación.

Nombre paciente: .....

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

Nombre Investigador principal.....

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

Nombre director Institución o su delegado.....

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