

T
1168

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124072

24072

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Relación del estado de metilación del gen *hMLH1* con la expresión de su proteína, y su asociación con tabaco, alcohol e infección por VPH-16 en cáncer bucal y orofaríngeo. Estudio de casos y controles.

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Imelda del Carmen González Ramírez

Comité tutorial:

Co-Tutor: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador

Co-Tutor: Dra. Claudia María García Cuellar

Asesor: Dra. María Esther Irigoyen Camacho

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

Imelda del Carmen González Ramírez
El 2 de diciembre del 2010

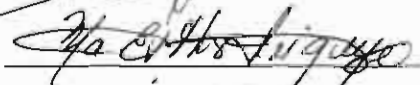
Cotutor: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador



Cotutor: Dra. Claudia María García Cuellar



Asesor: Dra. María Esther Irigoyen Camacho



Sinodal: Dra. Claudia Haydée González de la Rosa



Sinodal: Dr. Carlos Pérez Plasencia



Resumen

La metilación en el promotor del gen *hMLH1* esta relacionada con su inactivación, estos mecanismos se han relacionado con la carcinogénesis del carcinoma bucal y orofaríngeo (CByO). El objetivo del presente estudio fue estimar la asociación de la metilación en el promotor del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína con la presencia de CByO y su posible relación con la infección por VPH-16 y el consumo de tabaco y alcohol. Se diseño un estudio de casos y controles pareado por edad y sexo que incluyo 51 casos de CByO y 204 controles, con una mediana de edad de 64 (Q₁-Q₃ 54-70) años. El análisis del promotor del gen *hMLH1* fue realizado mediante un PRC específico para metilación (MSP) y la expresión de la proteína fue determinada mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se diseño un modelo de regresión logística condicional para estimar la asociación entre la presencia de CByO y los factores de riesgo. La metilación del gen *hMLH1* fue observada en 38 (74%) de los casos de CByO, en ninguna muestra de los controles se observo metilación. De los 38 casos de CByO metilados, 12 (31%) no presentaron expresión de la proteína y correspondían a etapas clínicas tempranas de la enfermedad. Todas las muestras no metiladas expresaron la proteína. Los resultados de análisis de regresión logística múltiple ajustado por sexo y tabaco, mostraron una RM de 19.11 (IC 95%: 1.88-193.63, $p = 0.013$) para la metilación y la falta de expresión de la proteína en etapas tempranas de la enfermedad. La frecuencia de infección por VPH en las muestras de CByO fue del 2%. Los hallazgos de la presente investigación sugieren que la metilación del gen *hMLH1* y la falta de expresión de su proteína es un evento epigenético temprano, y que posiblemente se mantenga en las etapas avanzadas de la enfermedad del CByO.

Abstract

Promoter methylation is believed to inactivate the expression of *hMLH1* this process has been implicated in the tumorigenesis of squamous cell carcinoma of the oral and oropharynx (OOPC). The aim of this study was to determine the profile of *hMLH1* promoter methylation and protein expression in OOPC, and their correlation with the risk factors tobacco, alcohol and HPV. Matched case-control study that included 51 OOPC cases and 204 controls, median age 64 (Q₁-Q₃ 54-70) years. Protein expression was determined by immunohistochemical staining, and *hMLH1* gene promoter methylation was analyzed by methylation specific polymerase chain reaction (MPS). A conditional logistic regression model for risk factors was built for OSCC and matched controls. Promoter methylation of *hMLH1* was detected in 38 (74%) of the OSCC cases and in none of control samples. Of the 38 OSCC samples with promoter methylation, 12 (31%) were negative for hMLH1 protein, and corresponded to early clinical stages. All 13 unmethylated samples showed positive stain for hMLH1. Multiple logistic regression analysis showed an OR of 19.11 (IC 95%: 1.88-193.63, $p = 0.013$) for methylation of the *hMLH1* gene and early stages of OSCC, adjusting by gender and tobacco use. HPV infection was determined in only one case (2%). The present study showed a high frequency of *hMLH1* promoter methylation that occurred in most of the early stage cases and in about half of the late stage cases. It is proposed that *hMLH1* promoter methylation is an early event that is maintained during tumor progression.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de cuadros	III
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Epidemiología del cáncer bucal y orofaríngeo	1
1.2	Factores de riesgo del cáncer bucal y orofaríngeo	2
1.2.1	Tabaco	3
1.2.2	Alcohol	6
1.2.3	Infección por Virus del Papiloma Humano	8
1.2.3.1	Infección del VPH y transformación maligna	9
1.2.3.2	Características moleculares del VPH	10
1.2.3.3	Prevalencia de VPH en CByO	12
1.2.3.4	Características clínico patológicas del CByO VPH+	14
1.2.4	Antecedentes familiares de cáncer	16
1.2.5	Inestabilidad genómica	17
1.2.6	El sistema de reparación de bases mal apareadas	19
1.2.6.1	Gen hMLH1	21
1.2.7	Eventos epigenéticos	23
1.2.7.1	Epigenética de células normales	24
1.2.7.2	Metilación de ADN	25
1.2.7.3	Metilación de genes y cáncer	26
1.2.7.3.1	Metilación de genes en cáncer de cabeza y cuello	26
1.2.7.3.2	Metilación del gen <i>hMLH1</i> en cáncer de cabeza y cuello...	27
2	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31

4	JUSTIFICACIÓN	31
5	HIPÓTESIS	33
6	OBJETIVO GENERAL	33
6.1	Objetivos particulares	33
7	MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1	Diseño del estudio	34
7.2	Sujetos participantes	34
7.2.1	Criterios de inclusión de los casos	34
7.2.2	Criterios de exclusión de los casos	35
7.2.3	Criterios de inclusión de los controles	35
7.2.4	Criterios de exclusión de los controles	35
7.3	Variables	36
7.3.1	Criterios operacionales	37
7.3.2	Ficha de recolección de datos	38
7.4	Análisis estadístico	38
7.4.1	Tamaño de muestra	38
7.5	Procedimientos clínicos	38
7.6	Procedimientos de laboratorio	40
7.6.1	Extracción y purificación de ADN	40
7.6.2	Reacciones de PCR	42
7.6.2.1	Amplificación del gen β -globina	43
7.6.2.2	Análisis del patrón de metilación del gen <i>hMLH1</i>	44
7.6.2.2.1	Modificación del ADN con bisulfito de sodio	44
7.6.2.3	PCR específico para metilación (MSP)	45
7.6.2.4	Amplificación de VPH	46
7.6.3	Análisis de expresión de la proteína hMLH1	49

	7.6.3.1	Inmunohistoquímica	49
	7.6.3.2	Conteo de expresión celular de la proteína hMLH1 en CByO	50
8		RESULTADOS	51
	8.1	Características clínico y demográficas	51
	8.2	Asociación de factores de riesgo con CByO	52
	8.3	Análisis del promotor del gen <i>hMLH1</i>	52
	8.4	Expresión de la proteína hMLH1	53
	8.5	Determinación de la infección por VPH en CByO	53
9		DISCUSIÓN	63
	9.1	Características clínico patológicas de los casos	63
	9.2	Metilación del gen hMLH1 y expresión de su proteína en CByO	64
	9.3	Infección por VPH y cáncer bucal y orofaríngeo	72
	9.4	Limitaciones del estudio	78
10		CONCLUSIONES	80
11		PERSPECTIVAS	81
12		POSIBLES APLICACIONES	82
13		REFERENCIAS	83
14		ANEXOS	106
15		TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS	112
16		PUBLICACIONES	113

ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Comitee on Cancer
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CBYO	Cáncer bucal y orofaríngeo
CCyC	Cáncer de cabeza y cuello
CIN	Chromosomal instability
CVADS	Cáncer de vías aéreas digestivas superiores
DNMTs	ADN metiltransferasas
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IARC	International Agency of Cancer Research
IC	Intervalo de confianza
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
MMR	Mismatch repair
MSI	Microsatellite Inestability
MSP	PCR específico para metilación
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q ₁ -Q ₃	Intervalo intercuartilar
RM	Razón de momios
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UB	Unidades de bebida
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Genoma del VPH	9
Figura 2.	Mecanismos de alteraciones genéticas y epigenéticas del CByO	11
Figura 3.	Estructura del gen <i>hMLH1</i>	22
Figura 4.	Principales alteraciones epigenéticas	24
Figura 5.	Muestras representativas de resultados de MSP	53
Figura 6.	Tinción de inmunohistoquímica para <i>hMLH1</i>	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Diferencias entre carcinomas de cabeza y cuello VPH negativos y positivos	16
Cuadro 2.	Genes frecuentemente metilados en cáncer de cabeza y cuello	29
Cuadro 3.	Metilación del gen <i>hMLH1</i> en tumores de cabeza y cuello	30
Cuadro 4.	Secuencias de oligonucleótidos utilizados y producto esperado	42
Cuadro 5.	Características clínico-demográficas de los casos y controles	56
Cuadro 6.	Características clínico-patológicas de 51 casos con CByO	57
Cuadro 7.	Razón de momios e intervalos de confianza 95% para CByO	58
Cuadro 8.	Factores de riesgo y características clínico-patológicas de acuerdo al estado de metilación del gen <i>hMLH1</i> en CByO.....	59
Cuadro 9.	Factores de riesgo y características clínico-patológicas de acuerdo con la expresión de proteína hMLH1 en CByO	60
Cuadro 10.	Diferencias en la expresión de la proteína de acuerdo al grado histológico en CByO	61
Cuadro 11.	Razón de momios e intervalos de confianza 95% de CByO	62

1. Introducción

1.1 Epidemiología del cáncer bucal y orofaríngeo

El cáncer bucal y orofaríngeo (CByO) en conjunto, es el cáncer más frecuente del tracto aerodigestivo superior y representa un problema de salud pública, no solo por sus graves manifestaciones clínicas y por la gran variedad de factores de riesgo individuales y ambientales con los que se encuentra relacionado, sino porque comúnmente se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad, asociándose a un pronóstico grave e importantes secuelas estéticas y funcionales.

En México, la información epidemiológica con relación al CByO es escasa, recientemente se publicaron los resultados del Registro Hospitalario de Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) del periodo 2000-2004, en el cual se analizaron 19,264 neoplasias malignas, de las cuales 497 correspondieron a CByO, lo que representó el 2.6% del total de éstas neoplasias, 417 casos fueron diagnosticados en cavidad bucal, 231 (55%) casos correspondieron a hombres y 186 (45%) a mujeres, en orofaringe se reportaron 80 casos, 65 (81%) en hombres y 15 (19%) en mujeres (Rizo y cols. 2007). En cuanto a la edad, se observó que la frecuencia mayor de estas neoplasias se presentó en los grupos de edad de más de 70 años, relacionándolo con género, 91 casos de CByO en hombres fueron diagnosticados en pacientes mayores de 70 años, de los cuales 77 correspondían a cavidad bucal y 14 a orofaringe, por otro lado, en mujeres del grupo de edad de mas de 70 años la frecuencia de casos de CByO fue similar a la reportada para los hombres, registrándose 83 casos, 78 fueron en cavidad bucal, por otro lado, en orofaringe la frecuencia fue menor con respecto a los hombres, registrándose únicamente 5 casos en mujeres (Rizo y cols. 2007).

Recientemente, un estudio de mortalidad de CByO en México reportó que 15,576 muertes fueron atribuidas a este tipo de neoplasias en el periodo de 1979 al 2003, con una tasa de mortalidad de 1/100,000 habitantes; por otro lado, la razón hombre:mujer fue de 1.9:1 para el año 2003 (Anaya y cols. 2008).

La acumulación de diversos cambios genéticos (Little 2010) y epigenéticos (Esteller 2008) asociados con el desarrollo del CByO sugieren dos diferentes vías moleculares asociadas con la carcinogénesis, una asociada a la exposición de algunos agentes carcinogénicos presentes en el tabaco y alcohol, sin la participación de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), y la otra exclusivamente con la participación del VPH (D'Souza y cols. 2009, Guerrero-Preston y cols. 2009, Gillison y cols. 2008, Ji y cols. 2008, Westra y cols. 2008).

1.2 Factores de riesgo del cáncer bucal y orofaríngeo

El riesgo de desarrollar CByO ha sido relacionado con la intensidad y duración de la exposición tanto al tabaco como al alcohol, con evidencia de una interacción sinérgica (Bettcher y cols. 2008, McCullough y Farah 2008, Hashibe y cols. 2007). En un estudio de casos y controles se reportó que los individuos con altos niveles de consumo de tabaco y alcohol presentan un riesgo mayor a 50 veces de presentar cáncer bucal, en comparación con el grupo de individuos que no presentan éstos hábitos (IC 95% 10-134) (Castellsagué y cols. 2004). Por otro lado, estudios epidemiológicos ha sugerido el papel causal del VPH en la génesis del CByO (Gillison y cols. 2008, D'Souza y cols. 2007, Herrero y cols. 2003). La detección de VPH ha sido reportada en aproximadamente 25% de los tumores de cabeza

y cuello (Kreimer y cols. 2005). En CByO se han reportado frecuencias de infección por VPH que varían del 0 al 100% (Ha y Califano 2004).

La historia familiar de cáncer es otro factor de riesgo importante asociado con la presencia CByO, se ha reportado que en individuos con éste antecedente genético el riesgo de presentar CByO se incrementa hasta 7.1 veces, en comparación con aquellos que no presentan antecedentes familiares de cáncer (Garavello y cols. 2008).

1.2.1 Tabaco

El consumo de tabaco constituye una importante causa de mortalidad en el mundo, se ha estimado que 5 millones de personas han muerto por esta causa en el año 2008, y se calcula que para el año 2030 serán 8 millones de muertes atribuidas a este factor de riesgo (Bettcher y Sanda 2008). Basado en evidencias epidemiológicas, se ha demostrado la relación existente entre el consumo del tabaco y diversos tipos de cáncer, como el cáncer de las vías aerodigestivas superiores (CVADS), entre los cuales se encuentran los de cavidad bucal, faringe, laringe y esófago; por otro lado, el consumo de tabaco también se encuentra asociado con el cáncer de páncreas, pulmón, colon, estómago, mama, cérvix y leucemia mieloide (WHO 2008).

Existen estudios que han reportado que la asociación del tabaco con el CByO no se limita al consumo de cigarrillos, esta asociación también ha sido reportada en los consumidores de tabaco sin humo, es decir, en aquellos que utilizan presentaciones de tabaco que involucren mastigarlo, untarlo o colocarlo sobre la encía, con la finalidad de que sea absorbido por las mucosas (Goldenberg y cols. 2004). Se ha reportado que el riesgo de

presentar cáncer bucal se incrementa de 5 a 6 veces con la aplicación del tabaco sobre las mucosas (Idris y cols. 1998).

Por otro lado, la combustión del tabaco origina un tipo de humo que contiene más de 4,000 compuestos químicos; de manera específica la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) ha identificado más de 69 agentes carcinógenos en el humo del tabaco, entre ellos 11 son carcinogénicos para los humanos, 7 son probablemente carcinogénicos para los humanos; y 49 son carcinogénicos para los animales (no se han probado en los humanos) (UNEP 1999). Los más fuertes carcinogénicos presentes en el humo de tabaco son: los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas, las aminas aromáticas, los aldehídos y el benceno. Los productos de la combustión del tabaco se dividen en dos fases, una fase particulada y una fase de gases. La fase particulada esta formada principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y N-nitrosaminas, siendo el Benzo[a]pireno y las nitrosaminas derivadas de la nicotina los compuestos más abundantes de estos grupos, por otro lado, la fase de gases de la combustión del tabaco esta compuesta principalmente por monóxido de carbono, dióxido de carbono, amonio y formaldehído (WHO 1992). Los HAP requieren de una activación metabólica para interactuar con el ADN, la mayoría de estos compuestos son metabolizados por las enzimas de la familia del citocromo P450. El principal mecanismo de los HAP en la carcinogénesis es la inducción de aductos con el ADN, los cuales pueden inducir mutaciones en genes críticos, como los genes supresores tumorales (Hecht 1999). Adicionalmente, se ha descrito que el humo del tabaco es capaz de regular la expresión de genes a través de mecanismos epigenéticos como la metilación de promotores (Hecht 1999). Las alteraciones en la metilación del ADN inducidas por el humo de tabaco,

particularmente por las nitrosaminas derivadas de la nicótica, se ha relacionado con un incremento en la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMT), desencadenando vías de señalización que podrían incrementar la expresión de las DNMT (Tang y cols. 2009).

Por otro lado, aunque está bien establecido el factor de riesgo que representa el consumo de tabaco en el desarrollo de cáncer, no todos los individuos que se encuentran expuestos a este factor de riesgo desarrollan este tipo de neoplasias, lo cual sugiere la existencia de una susceptibilidad de los individuos a los productos de la combustión del tabaco, los polimorfismos genéticos pueden modular esta asociación observada entre la exposición al tabaco y la presencia de cáncer bucal y orofaríngeo (Taiolli 2008).

Algunos de los polimorfismos más ampliamente estudiados son aquellos que codifican para las enzimas de fase I y de fase II, involucradas en la activación y conjugación de los carcinogénicos producidos por el humo del tabaco (Lodovici y Bigagli 2009). En el grupo de enzimas fase I se han reportado polimorfismos en los genes *CYP1A1* y *CYP2A6* asociados con CVADS, por otro lado, en el grupo de enzimas fase II se encuentran los genes de la familia glutatión-s-transferasa (*GSTM*, *GSTT* y *GSTP*). Otros polimorfismos relacionados con el metabolismo del tabaco y asociados con CVADS son los reportados en los genes de la N- acetiltransferasa (*NAT1* y *NAT2*) (Canova y cols. 2010). La variante del gen *CYP2A6* puede influir en el metabolismo de las nitrosaminas y modular el riesgo que representa el fumar en el desarrollo de cáncer (Spitz y cols. 2004).

1.2.2 Alcohol

El mecanismo por el cual el consumo de alcohol representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de CVADS no ha quedado claro (Hashibe y cols. 2006). Algunas hipótesis proponen que el alcohol puede actuar como un solvente para los compuestos carcinógenos del tabaco (Brennan y Boffetta 2003). Existen controversias relacionadas con el papel que el consumo de alcohol desempeña en el desarrollo del CByO, un estudio que analizó los resultados de tres estudios de casos y controles realizados en poblaciones diferentes (Estados Unidos, Italia y China), en los que se evaluaron los factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer bucal, entre los cuales se analizó el consumo alcohol, en este estudio se reportó que el consumo de alcohol en Estados Unidos representaba un riesgo altamente asociado con la presencia de cáncer bucal, mientras que para la población italiana el consumo de alcohol no represento un incremento en el riesgo para el desarrollo de cáncer bucal en comparación con los no bebedores (Macfarlane y cols. 1995). Por otro lado, en un estudio de casos y controles realizado en no fumadores, se reportó que el riesgo de desarrollar CByO en aquellos que consumían más de 3 unidades de bebida al día fue de 2.6 (IC 95% 0.7-9.3) (Fioretti y cols. 1999), lo cual sugiere que el alcohol es el principal factor de riesgo para CByO en los individuos sin historia de consumo de tabaco.

Por otro lado, se ha demostrado que el acetaldehído, principal metabolito del alcohol, es el principal compuesto que es considerado como mutagénico (McCullough y cols. 2008, Brennan y Boffetta 2003). La IARC en 1999 concluyó que en humanos la evidencia de que el acetaldehído tiene una naturaleza carcinogénica es inadecuada, sin embargo de forma experimental en animales si representa un compuesto carcinogénico, por

lo tanto fue clasificado como posible carcinogénico en humanos (IARC 1999). El alcohol es metabolizado a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), mientras que la conversión del acetaldehído a ácido acético es catalizada por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). El alcohol y el aldehído son metabolizados principalmente en el hígado, pero el metabolismo de la ADH y la ALDH también ocurren en el tracto aereodigestivo superior, por lo cual los polimorfismos reportados en los genes *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH7* y *ALDH2* se han relacionado con CVADS (Hashibe y cols. 2008, 2006, Peters y cols. 2005).

Un estudio reciente (Warnakulasuriya y cols. 2008) realizado en pacientes con cáncer bucal y displasia epitelial demostró mediante inmunohistoquímica, los cambios inducidos por el alcohol en el epitelio de la mucosa bucal. En este estudio se evaluaron las alteraciones que el etanol induce en el ADN, estos hallazgos proporcionan evidencia de la importante participación del etanol en la carcinogénesis de la cavidad bucal (Warnakulasuriya y cols. 2008).

Con respecto a la susceptibilidad genética al CVADS, en un estudio multicéntrico de casos y controles, en el que se examinaron tres genes relacionados con el metabolismo del etanol, se demostró que los pacientes con hábito alcohólico intenso y que presentaban polimorfismo en el gen aldehído deshidrogenasa 2 (*ALDH2*) tenían un incremento significativo de riesgo de desarrollo de CVADS (RM 5.79 IC 95% 1.49-22.5 $p=0.0007$) (Hashibe y cols. 2006).

1.2.3 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El VPH forma parte de la familia de los *Papillomaviridae*, es un virus epiteliotrópico que puede inducir lesiones hiperplásicas, papilomatosas y verrucosas en el epitelio escamoso estratificado de la piel y de las mucosas (Shukla y cols. 2009). Los VPH poseen una sola molécula de ADN de doble cadena, formada por 8,000 pares de bases (pb) que mide aproximadamente unos 50 nm de diámetro (Bernard 2005). Se ha reportado la existencia de más de 120 tipos diferentes de VPH, sin embargo solo se ha secuenciado el genoma completo de unos 100 tipos (Bernard 2005).

La organización genética de todos los VPH es similar, formada por tres grandes regiones, una región temprana en la que se encuentran los genes responsables de la transcripción, replicación y transformación, conocidos como genes E (E1, E2, E4, E5, E6, y E7), una región tardía, que codifica dos proteínas de la cápside, la proteína L1 mayor y la proteína L2 menor, y finalmente una región larga de control, que contiene elementos de regulación para la transcripción y replicación viral (Tanti y cols. 1999) (Figura 1). Es importante señalar que la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de ADN, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional (García-Carranca y cols. 1993).

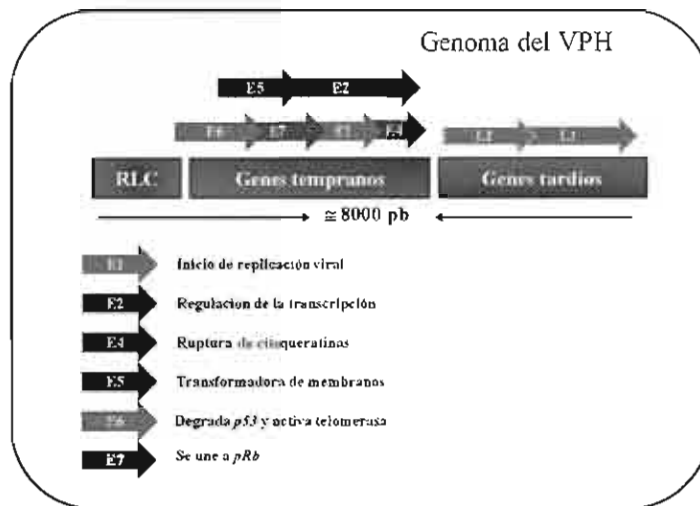


Figura 1. Genoma del VPH

1.2.3.1 Infección del VPH y transformación maligna

La transmisión por los VPH es diversa: puede ocurrir en el periodo perinatal (Tanti y cols. 1999), en las siguientes décadas de la vida, por contacto sexual (Scully 2002) y por auto inoculación (Summersgill y cols. 2001), por otro lado, algunos autores sugieren una posible transmisión por saliva (Gutman y cols. 1999). La infección por VPH al adquirirse en distintas etapas de la vida, ha sido reportada con diferentes prevalencias, dependiendo de la etapa de la vida donde fue adquirida, por ejemplo en la población infantil se ha reportado hasta en un 6%, en los adolescentes en un 13% y en la población adulta hasta en un 23% (Summersgill y cols. 2001).

Cada tipo de VPH se encuentra asociado con el desarrollo de lesiones específicas que se localizan en sitios anatómicos definidos del epitelio escamoso de piel y de mucosas (Hazard y cols. 2007). Los VPH se han clasificado en dos grandes grupos: en virus de alto y bajo riesgo, basados principalmente en el tipo y pronóstico de la lesión que son capaces de inducir después de la infección (Muñoz y cols. 2003).

Con base en evidencia molecular y epidemiológica, en 1995 la IARC reportó el efecto carcinogénico de los VPH tipo 16 y 18 en humanos (IARC 1995). Por otro lado, desde 1983 Syrjänen y cols. (1983) observaron algunas características morfológicas e inmunohistoquímicas sugestivas de la infección por VPH en los carcinomas bucales de células escamosas. Con el primer reporte de detección de VPH de alto riesgo (deVilliers y cols. 1985), en especial de los tipos 16, 31 y 33 en cáncer bucal se inició la búsqueda de la asociación de este biomarcador con la presencia de CByO.

1.2.3.2 Características moleculares del VPH

La inactivación del *p53* y *pRb* son eventos comunes en la mayoría de los tumores de cavidad bucal y orofaríngea, sin embargo estas alteraciones ocurren por diferentes mecanismos en los tumores VPH positivos y en los VPH negativos. Las alteraciones genéticas en los tumores positivos a VPH se ven reguladas por las oncoproteínas E6 y E7, que inactivan la función de *p53* (Wiest y cols. 2002). Un estudio reciente reportó que el 57% de los tumores de amígdala VPH positivos presentaban mutación en el gen *p53*, en contraste con los tumores VPH negativos donde el gen *p53* no se encontró mutado (57% vs 0% $p=0.008$) (Westra y cols. 2008). La proteína E7 tiene la capacidad de disminuir la expresión de la ciclina D y de *pRb*, favoreciendo la expresión del gen *p16* en los casos de CByO positivos a VPH (Ji y cols. 2008).

Con estos hallazgos se fortalece la teoría de la existencia de los dos posibles mecanismos de carcinogénesis en tumores de cabeza y cuello, por un lado los tumores de CByO VPH positivos, que se encuentran asociados con un tipo silvestre de *p53*, una baja regulación de ciclina D y *pRb*, así como una sobreexpresión de *p16*; mientras que los

tumores VPH negativos se caracterizan por presentar, mutaciones en el gen *p53*, un incremento en la ciclina D, un normal o incrementado nivel de *pRb* y un decremento en la expresión del gen *p16* (Guerrero-Preston y cols. 2009) (Figura 2).

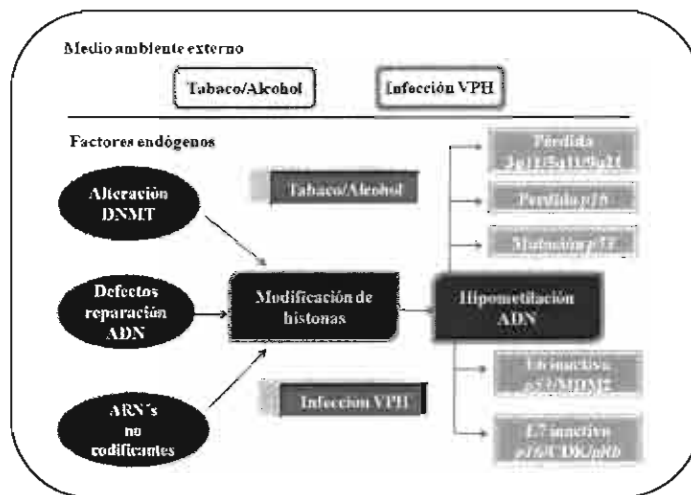


Figura 2. Mecanismos de alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer bucal y orofaríngeo.

En el contexto de los eventos epigenéticos, un estudio reciente determinó el estatus de la metilación global del ADN en tumores de cavidad bucal, como un evento temprano en los procesos carcinogénicos de este tipo de tumores, reportando que el índice de metilación del ADN fue de 4.28 (IC 95% 4.1-4.4), sin embargo, al buscar asociación de la metilación global con otras variables como tabaco, alcohol e infección por VPH los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa (Guerrero-Preston y cols. 2009). La regulación epigenética en la infección por VPH participa de forma trascendente en el proceso de la carcinogénesis del CByO. En un estudio reciente realizado en el INCan, se analizó el patrón de metilación del VPH-16 en cáncer de cavidad bucal, demostrando que la metilación de ADN juega un papel importante en el ciclo de vida del VPH-16, participando

en el silenciamiento transcripcional de las células indiferenciadas, lo cual favorece su estado de latencia (Balderas-Loeza y cols. 2007).

1.2.3.3 Prevalencia de VPH en cáncer bucal y orofaríngeo

En los tumores de cabeza y cuello la asociación con el VPH ha sido más fuertemente relacionada con el cáncer de orofarínge, que con los carcinomas de la cavidad bucal, la posibilidad de detección de VPH en los carcinomas localizados en orofaringe es del 50% o más (Hammarstedt y cols. 2006, Klusmann y cols. 2001). Las frecuencias altas de VPH en los carcinomas de orofaringe se han relacionado con la facilidad del acceso viral a las células basales de las criptas amigdalinas, y a una aparente predilección por este sitio anatómico, que presenta analogía con la zona de transformación del cérvix. En un meta análisis se reportó una fuerte asociación entre VPH-16 y cáncer de amígdala (RR 15.1 IC95% 6.8-33.7) (Hobbs y cols. 2006). Estudios previos reportaron que la frecuencia de casos de cáncer bucal VPH positivos, analizados mediante el uso de la técnica de PCR, varía del 4 al 71% (Herrero y cols.2003, Smith y cols. 1998). El VPH-16 es el tipo viral más frecuentemente asociado con los diversos carcinomas de cabeza y cuello (D'Souza y cols. 2007, Gillison y cols. 2008), se ha reportado que las frecuencias en los CByO VPH-16 positivos van del 16.5 al 90% (Gillison y cols. 1999, Schwartz y cols. 1998).

Las frecuencias de CByO asociados con la infección por VPH son muy variables, debido probablemente a diferencias en los métodos seguidos por los diferentes estudios, entre los que destacan el número de casos incorporados, el tipo de población sujeta a estudio, el método y sitio de recolección de la muestra, la técnica de extracción de ADN así como el método molecular utilizado para la detección del ADN viral. Los métodos usados

AVM
MONTAÑES
ARCHIVO HISTORICO
MONTAÑES
MONTAÑES

para el diagnóstico de la infección por VPH están basados principalmente en la detección del ADN viral y han sido agrupados en ensayos de alta sensibilidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos de moderada sensibilidad como el Southern blot y de baja sensibilidad como la hibridación *in situ* o inmunohistoquímica (Miller y cols. 1996). Actualmente la técnica más utilizada para la detección de ADN-VPH es la técnica de PCR, debido a su alta sensibilidad, accesibilidad y bajo costo (Molijn y cols. 2005).

Con respecto a las diferencias geográficas, la variabilidad en las frecuencias pudiera ser atribuida a las características étnicas de la población, por ejemplo, en tres poblaciones diferentes se muestran prevalencias variadas para el carcinoma de cavidad bucal asociado con la infección por VPH: en una población africana se detectó VPH en el 1% (Van Rensburg y cols. 1996), en una población de Finlandia se observó un 30% de casos de cáncer bucal con VPH (Chang y cols. 1990), y en una población de Taiwán el 76% de los carcinomas de cavidad bucal se asoció con la presencia de VPH (Chang y cols. 1989). Otro factor a considerar en la variabilidad de las frecuencias es el tamaño de la muestra; el estudio que presenta el índice más alto de detección tiene un número muy reducido de pacientes (Smith y cols. 1998), en el que se analizaron solo 14 muestras positivas a VPH, de las cuales 10 (71%) resultaron positivas a VPH de alto riesgo, en contraste, la prevalencia del 4% proviene de un estudio multicéntrico realizado en nueve países y que incluyó 1,670 pacientes (Herrero y cols. 2003).

En un estudio de casos y controles reciente, realizado en el INCan (Anaya-Saavedra y cols. 2008), en el que se incluyeron 62 pacientes con cáncer bucal, la prevalencia reportada para los casos VPH positivos fue del 43%, siendo los tipos VPH-16 y 18 los más frecuentes (55% y 18% respectivamente). En este estudio el 53% de los casos de cáncer

bucal con infección por VPH, no tenían historia de consumo de tabaco y alcohol, adicionalmente, el 16% de los casos incluidos que resultaron VPH negativos, no presentaban los antecedentes de consumo de tabaco y alcohol. La prevalencia de VPH en cáncer bucal reportada en el estudio de Anaya y cols. (2008), coincide con lo reportado por otro estudio previo realizado en el INCan, en el que se reportó una frecuencia de VPH asociada a cáncer bucal del 42% (Ibieta y cols. 2005).

1.2.3.4 Características clínico-patológicas del CByO VPH+

Diversos estudios han reportado la presencia de tumores de cavidad bucal y orofarínge asociados a VPH en pacientes jóvenes (40 a 60 años), por otro lado, los pacientes con CByO VPH negativo generalmente son mayores (≥ 60 años), en promedio son 5 años mayores (Fakhry y cols. 2008, D'Souza y cols. 2007, Smith y cols. 2004, Strome y cols. 2002). Un estudio reciente reportó que los pacientes con CByO positivos a VPH eran predominantemente de raza blanca y que adicionalmente presentaban un alto nivel educativo y económico, en comparación con los negativos a VPH (Gillison y cols. 2008).

Otro aspecto importante asociado a los casos de CByO VPH positivos es el factor pronóstico, un meta análisis reciente reportó el impacto en la supervivencia de los CVADS con infección por VPH, demostrando que los pacientes positivos para VPH tenían un bajo riesgo de muerte (meta RR 0.85 IC 95% 0.7-1.0), así como un bajo riesgo de recurrencia (Meta RR 0.62 IC95% 0.5-0.8) en comparación con los pacientes con CByO VPH negativos (Ragin y cols. 2007). Datos sobre un estudio prospectivo en fase 2 (Fakhry y cols. 2008), confirmaron que la infección por VPH predice una mejor respuesta a tratamiento con quimioterapia y radioterapia. El estatus de VPH en tumores de orofarínge

fue estadísticamente significativo en relación con la respuesta a la terapia de inducción (82% contra 55%), por otro lado, la supervivencia mejoró cuando fue evaluada a los 2 años (95% contra 62%) y el riesgo de progresión de la enfermedad fue 72% más bajo de lo observado en los pacientes VPH negativos (Fakhry y cols. 2008).

La evaluación de la respuesta a la terapia, en otro estudio en pacientes con cáncer de orofaringe, se encontró que la presencia de VPH-16 se asoció a una mejor respuesta a la quimioterapia ($p=0.001$) y a la terapia combinada de quimioterapia con radioterapia ($p=0.0005$), así como con una mejor supervivencia ($p=0.007$) (Worden y cols. 2008). En un estudio de 100 pacientes con cáncer de orofaringe y co expresión de VPH/*p16*, se demostró que presentaban una mejor supervivencia en comparación con aquellos pacientes con tumores VPH negativos, o positivos pero que no expresaban *p16* (Weinberger y cols. 2006), lo cual revalida la correlación existente entre la expresión de VPH y *p16* (Kumar y cols. 2008). Estos resultados confirman que el estatus de VPH es un buen biomarcador pronóstico en los tumores de cabeza y cuello. Existen características específicas asociadas al estatus del VPH en los tumores de cabeza y cuello que permiten tomar decisiones terapéuticas para cada caso (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias entre los carcinomas de cabeza y cuello de acuerdo al estado del VPH

VPH negativos	VPH positivos
Factores moleculares	
Pérdida de <i>p53</i> , por mutación	Presencia de <i>p53</i> silvestre
Aumento en la regulación de <i>pRb</i>	Disminución en la regulación de <i>pRb</i>
Baja expresión de <i>p16</i>	Sobre-expresión de <i>p16</i>
Sobre-expresión de ciclina D	Baja expresión de ciclina D
No ADN/ARN VPH	Presencia de ADN/VPH (>85% tipo 16) VPH E6 y E7
Factores epidemiológicos	
Fumadores intensos	No fumadores
Bebedores intensos	Mínimo o moderado consumo de alcohol
Baja exposición a la marihuana	Alta exposición a la marihuana
Baja exposición de sexo oral	Alta exposición de sexo oral
Pacientes mayores (>50 años)	Pacientes jóvenes (<45 años)
Bajo estado socioeconómico	Alto estado socioeconómico
Decremento de incidencia	Incremento de incidencia
Factores clínicos	
Todos los sitios de cabeza y cuello	Predominantemente orofarínge (amígdala y base de lengua)
Mal pronóstico de sobrevida	Buen pronóstico de sobrevida
Impredecible respuesta a radioterapia	Radiosensible

1.2.4 Antecedentes familiares de cáncer

Son escasos los estudios que han evaluado la existencia de antecedentes heredofamiliares con la presencia del CByO. La presencia de antecedentes familiares de cáncer bucal y orofaríngeo, puede involucrar aspectos genéticos y ambientales, incluyendo la susceptibilidad genética y la exposición a factores exógenos (Garavello y cols. 2008).

Un estudio de casos y controles en E.U. reportó una RM de 1.2 (IC 95% 0.7-2.3) para los pacientes con historia de cáncer bucal y orofaríngeo, y una RM de 1.6 (IC 95% 0.7-3.8) para aquellos con historia de cáncer de esófago y laringe (Goldstein y cols. 1994). En otro estudio de casos y controles en Puerto Rico realizado en pacientes con cáncer bucal y faríngeo se reportó que aquellos pacientes con antecedentes familiares de primer grado de cáncer bucal y faríngeo tenían un riesgo 2.5 (IC 95% 0.8-8.0) veces mayor de presentar este tipo de neoplasias en comparación con los que no tenían este antecedente familiar, y un riesgo de 2.6 (IC 95% 1.4-4.8) veces para aquellos con antecedentes de CVADS (Brown y

cols. 2001). Un estudio realizado en la Ciudad de México recientemente reportó que los individuos con antecedentes familiares de cáncer presentaron un riesgo incrementado (3.6 veces) de cáncer bucal (Anaya-Saavedra y cols. 2008).

Adicionalmente, un estudio de casos y controles multicéntrico (Garavello y cols. 2008) analizó la relación existente entre el CByO y la historia familiar de cáncer en primer grado, los resultados del análisis multivariado mostraron que existe un riesgo alto en aquellos pacientes con historia familiar de cáncer bucal y faríngeo (RM 2.6, IC 95% 1.5–4.5), así como para cáncer de laringe (RM 3.8, IC 95% 2.0–7.2). Por otro lado, los individuos con dos o más familiares de primer grado con cáncer bucal y faríngeo/laríngeo, presentaron un riesgo de 7.1 (IC 95% 1.3–37.2) veces mayor de presentar este tipo de neoplasias en comparación con el grupo control. Con los hallazgos de este estudio se concluyó que la historia familiar en primer grado de cáncer bucal, faríngeo y laríngeo es fuertemente un riesgo de CByO, independientemente del tabaco y el alcohol (Garavello y cols. 2008).

1.2.5 Inestabilidad genómica

La combinación de los datos epidemiológicos y de biología molecular ha demostrado que pueden requerirse múltiples cambio genéticos en la tumorigénesis. Además, a consecuencia de estos cambios se podrían acumular más alteraciones genéticas que provocan daños tanto a nivel cromosómico como genómico, con lo cual se acelera el proceso tumoral. Por este motivo, el mantenimiento de la estabilidad genómica es de vital importancia para la supervivencia celular que depende de la correcta regulación de los

sistemas de respuesta celular al daño genómico y de la integridad de los sistemas de reparación del mismo.

La pérdida de la estabilidad genómica parece ser un paso clave que ocurre en las primeras etapas del proceso de la tumorigénesis. Este fenómeno contribuye a crear un ambiente permisivo para la ocurrencia de alteraciones de genes claves en el control de la proliferación celular, como genes supresores tumorales y genes reparadores de daño al ADN (Ponder 2001). En las células tumorales existen dos tipos de inestabilidad generadas a partir de vías diferentes: la inestabilidad a nivel cromosómico (translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidías o inversiones) y la inestabilidad de microsatélites en ADN (mutaciones puntuales o deleciones/inserciones de secuencias microsatélite) (Lengauer y cols. 1997).

La inestabilidad de microsatélites es el resultado de defectos en el sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR, Mismatch repair) que corrige los errores que se producen durante la replicación del ADN, tales como inserciones o deleciones de un nucleótido o más, o la sustitución de una base por otra (Jiricny 1998(a), Marra y Schar 1999). Si estas alteraciones no son detectadas por el sistema de reparación se acumulan en las células hijas durante la mitosis, lo cual puede favorecer el desarrollo de procesos neoplásicos. De manera general, la ADN polimerasa incorpora nucleótidos no complementarios en el ADN con una frecuencia de un error por cada 100,000 nucleótidos (Klinger y cols. 2002). A esta acumulación de mutaciones puntuales cabe añadir las alteraciones que afectan a secuencias repetitivas durante la replicación del ADN.

La preservación de la integridad genómica requiere el funcionamiento apropiado de varios mecanismos tales como la replicación, la reparación y el mecanismo de procesamiento del ADN; el sistema MMR es uno de los mecanismos encargados de reparar estos errores.

1.2.6 El sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR)

Las proteínas implicadas en el proceso de MMR están muy conservadas evolutivamente, lo que pone de manifiesto la importancia de este tipo de reparación para mantener la integridad del genoma en todos los organismos.

Se han identificado en humanos al menos 7 genes involucrados en el mecanismo del sistema hMMR: *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2* (Jiricny y Nyström-Lathi 2000). En estos genes se han encontrado numerosas mutaciones asociadas con diversos carcinomas cuyos tumores presentaban adicionalmente inestabilidad genómica.

Los genes homólogos de MutS son: *hMSH2*, *hMSH3* y *hMSH6* que forman dos heterodímeros que reconocen ADN desapareado: MutS α (*hMSH2/hMSH6*) y MutS β (*hMSH2/hMSH3*) (Acharya y cols. 1996, Habraken y cols. 1996). MutS α se une perfectamente a bases mal apareadas y a zonas de inserción/delección de una base, mientras que MutS β se une predominantemente a zonas de inserción/delección de 2-4 bases (Jiricny 1998).

Los genes homólogos de MutL son: *hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1* y *hPMS2*, los cuales pueden interactuar para formar dos heterodímeros, MutL α (*hMLH1/hPMS2*) y MutL β (*hMLH1/hPMS1*) (Guerrette y cols. 1999). MutL α puede interactuar con *hMSH2*, MutS α ,

MutS β y con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) con lo cual se forma un complejo indispensable para el funcionamiento del MMR (Gu y cols. 1998, Umar y cols. 1996).

Los complejos MutS/MutL reclutan elementos adicionales en la zona de reparación, acoplado el reconocimiento del apareamiento incorrecto y la discriminación de la cadena, la excisión y la resíntesis. La función acopladora del heterodímero MutL α probablemente depende de la unión de ATP y/o de la actividad de hidrólisis por los sitios N-terminal conservados de *hMLH1* y *hPMS2* (Ban y Yang 1998).

La mayoría de las mutaciones en los genes hMMR reportadas actualmente producen corrimientos del marco de lectura, mutaciones que introducen cambio pérdida del sentido o defectos en los sitios de estructuración, y son causadas por sustituciones de una base o pequeñas deleciones e inserciones, o ambas, generalmente de 1-5 pb (Samowitz y cols. 2002).

Detección de cadena dañada: Estudios realizados en levaduras y mamíferos han demostrado la implicación de PCNA en el mecanismo de detección de las cadenas dañadas, ya que este puede interactuar con los homólogos de MutS y MutL (Gu y cols. 1998, Umar y cols. 1996). PCNA es requerido antes y durante el paso de excisión, así como en la resíntesis del ADN (Gu y cols. 1998, Johansson y cols. 1996), sin la presencia de PCNA, el MMR no puede distinguir entre la cadena neosintetizada y la cadena madre, y esto conducirá a la formación de un bucle, lo cual conduce a la rotura del ADN de doble cadena.

Excisión y resíntesis: Se ha identificado la participación de tres exonucleasas en el sistema MMR: ExoI y las exonucleasas proofreading de las ADN polimerasa δ y ϵ , ExoI es

una exonucleasa 5'-3' que se activa para evitar las mutaciones (Szankasi y Smith 1995). La resíntesis de la cadena cortada parece estar coordinada por la acción de la ADN polimerasa δ y un complejo de proteínas como PCNA, las proteínas SSB (proteínas de estabilización de replicación en cadena sencilla), la proteína de replicación A (RPA), algunas helicasas y finalmente una ADN ligasa que completa la reacción del MMR (Lin y cols. 1998, Modrich 1997).

1.2.6.1 Gen *hMLH1*

El gen *hMLH1* es un gen reparador de daño al ADN, que pertenece al sistema MMR, es homólogo del gen MutL del *Escherichia coli*, y se encuentra localizado en la región 21 del brazo corto del cromosoma 3 (3p21), se encarga de corregir errores que ocurren durante la replicación y recombinación del ADN. Es un gen que se expresa principalmente en aquellas células que se encuentran en constante renovación, como las células de la mucosa gástrica y las de la mucosa bucal (Fink y cols. 1997, Fleisher y cols. 2000).

La región codificante del gen *hMLH1* consta de 2271 pb y 19 exones, su promotor esta constituido por 57 islas CpGs (Greenspan y cols. 2007) (Figura 3). Este gen codifica para la proteína hMLH1 que participa en la reparación de las bases mal pareadas, formando un heterodímero con la proteína hPMS2, formando el complejo hMutL α que coordina la interacción entre el complejo de reconocimiento de la lesión y otras proteínas que participan en el proceso de reparación del ADN (Schofield y Hsieh 2003, Mitchell y cols. 2002). Lipkin y cols. (2000) demostraron que el gen *hMLH1* también puede formar heterodímeros con *hMLH3* y *hPMS1*. El complejo *hMLH1/hMLH3* tiene una función similar a hMutL α en la reparación de las asas formadas por inserción/delección, mientras

que la función de *hMLH1/hPMS1* (complejo hMutL β) no ha sido claramente determinada (Buermeier y cols. 1999).

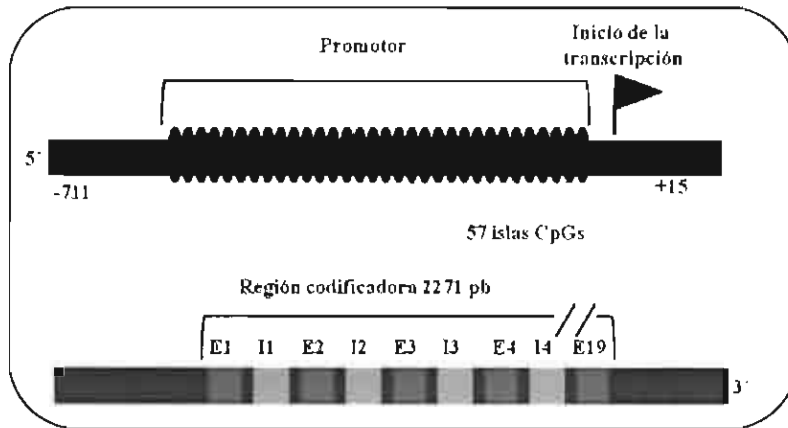


Figura 3. Estructura del gen *hMLH1*. El promotor del gen esta compuesto por 57 islas CpGs y su región codificante consta de 2271 pb.

El silenciamiento del gen *hMLH1* puede deberse a mecanismos genéticos, como son las mutaciones, o por mecanismos epigenéticos, como lo es la metilación de su promotor, la alteración de este gen por cualquiera de estos mecanismos favorece la inestabilidad cromosómica, contribuyendo con el desarrollo de diversos procesos neoplásicos (Sengupta y cols. 2007, Yearsley y cols. 2006).

Aunque algunas regiones del gen *hMLH1* parecieran presentar mayor frecuencia de mutación, el espectro mutacional es heterogéneo y abarca toda la región codificante (Vasen y cols. 1996). El cáncer de colon ha sido el principal modelo de estudio para el gen *hMLH1*, en este tipo de tumores se han descrito mas de 240 mutaciones, de las cuales aproximadamente el 60% corresponden al gen *hMLH1* (Peltomaki y Vasen 1997).

El gen *hMLH1* participa de forma importante con en la inestabilidad genómica, relacionándose de esta forma con diversos procesos carcinogénicos como: los carcinomas del tracto gastrointestinal (Poynter y cols. 2008, Fleisher y cols. 2000), los carcinomas de

endometrio (Broaddus y cols. 2006) y los carcinomas de cabeza y cuello (Sengupta y cols. 2007, Piccinin y cols. 1998).

Se ha descrito que las mutaciones en el codón de terminación natural de la proteína hMLH1 son claves para el desarrollo de ciertas neoplasias como el cáncer colorectal, se sabe que el dominio C-terminal es requerido para su dimerización con hPMS2 y para el reconocimiento del error en el ADN, se ha demostrado que la capacidad de dimerización del *hMLH1* es reducida en un 80% si su dominio C-terminal está afectado (Guerrette y cols. 1999).

1.2.7 Eventos epigenéticos

Los cambios heredables en la expresión del gen, que no son atribuibles a cambios en la secuencia del ADN, es decir, los acontecimientos biológicos que no pueden explicarse por los principios genéticos, y que pueden ser transmitidos a las células hijas durante la división celular son conocidos como cambios epigenéticos (Holliday 1987).

En una perspectiva clásica, se ha visto al cáncer como un grupo de enfermedades caracterizadas por anormalidades genéticas progresivas que incluyen mutaciones en genes supresores y oncogenes, además de anormalidades cromosómicas que pueden ir desde translocaciones, hasta la pérdida y ganancia de regiones cromosómicas completas. Sin embargo, en el desarrollo del cáncer también participan los eventos epigenéticos (Herman y Baylin 2003). Los cambios epigenéticos más frecuentemente estudiados son la metilación de ADN en el promotor de diversos genes y las modificaciones en los residuos de las histonas (Figura 4).

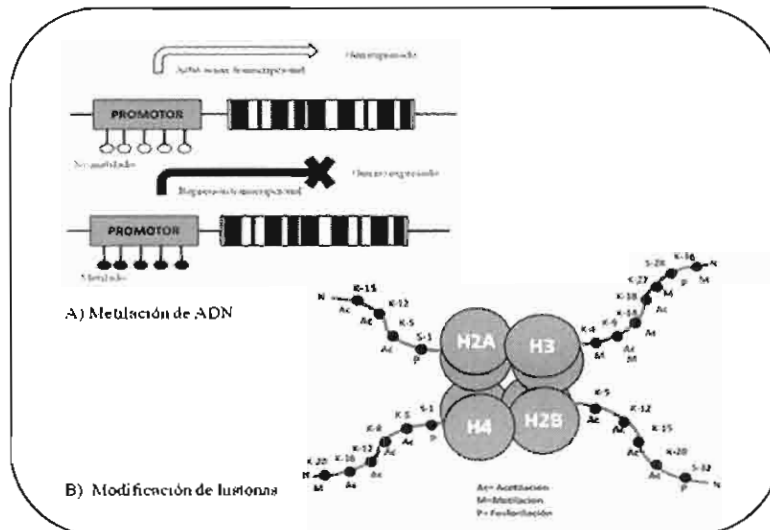


Figura 4. Principales alteraciones epigenéticas. A) La metilación del promotor reprime la transcripción del gen. B) Diferentes adiciones covalentes en los residuos de las histonas.

1.2.7.1 Epigenética de las células normales

El silenciamiento fisiológico de los genes a nivel de la cromatina es necesario para la vida de los organismos eucariontes y es un elemento clave en diferentes procesos biológicos que incluyen diferenciación, impronta génica y silenciamiento de grandes regiones cromosómicas (Nakao 2001).

En la impronta genómica los eventos epigenéticos tienen una importante participación, la hipermetilación de ADN de uno de los dos alelos de los padres asegura la expresión monoalélica, así como en la inactivación del cromosoma X en mujeres (Mundo-Ayala y Jaloma-Cruz 2008).

La metilación de ADN es un mecanismo de control de la expresión génica que se encuentra presente de forma normal en algunas etapas tempranas del desarrollo, así como en la inmovilización de transposones; por otro lado, la hipermetilación de secuencias repetidas del genoma previene inestabilidad cromosómica, translocaciones e interrupción génica causada por la reactivación de secuencias de transposones (Bird 2002).

1.2.7.2 Metilación de ADN

La metilación de ADN como modificación epigenética tiene un papel trascendente en el control de la actividad de los genes y en la arquitectura del núcleo celular; en los seres humanos esta modificación ocurre únicamente en las citosinas que se encuentran precediendo a una guanina, recibiendo el nombre de dinucleótidos CpG. Esta modificación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo en la posición C⁵ de las citosinas mediante la enzima ADN metiltransferasa (DNMT), en presencia del donador de metilos S-adenosil metionina (SAM); resultando 5-metilcitosina (5mC) (Herman y Baylin 2003).

Los dinucleótidos CpG se encuentran presentes uno por cada 80 dinucleótidos en el 98% del genoma humano, y cuando se encuentran agrupados en pequeños fragmentos de ADN reciben el nombre de islas CpGs, las cuales comprenden del 1 al 2% del total del genoma humano (Kargul y Laurent 2009). Las islas CpGs se encuentran ubicadas a lo largo de una de las cadenas de ADN, frecuentemente localizadas en la zona cercana al promotor de los genes, y que habitualmente no se encuentran metiladas (Herman y Baylin 2003).

Se ha observado que existe una correlación entre la densidad de residuos de citosina metiladas y la actividad transcripcional (Kass y cols. 1997). La unión covalente de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de citosina, no afecta el apareamiento de bases, pero interfiere la unión ADN-proteína, reduciendo la afinidad de factores de transcripción a la secuencia promotora, inhibiendo así la actividad transcripcional de un gen.

Las enzimas encargadas de la unión covalente de un metilo al anillo de citosina, son conocidas como DNMT's. Hasta ahora, se han caracterizado tres DNMT's (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B); la primera está encargada de metilar ADN hemimetilado; es decir,

mantiene los patrones de metilación, mientras que las otras dos son responsables de la metilación *de novo* del ADN (Cho y cols. 2004).

1.2.7.3 Metilación en el promotor de genes y cáncer

Estudios previos han demostrado que existe una correlación cercana entre la metilación y el silenciamiento de un gran número de genes relacionados con los procesos carcinogénicos (Esteller 2008, Robertson 2005, Strathdee y Brown 2002). En los procesos neoplásicos las alteraciones en la metilación inician principalmente con una hipometilación global, seguida de una hipermetilación que específicamente se localiza en las islas CpG de los promotores de genes (Feinberg y Tycko 2004).

El silenciamiento por metilación en el promotor de diversos genes es el evento epigenético frecuentemente asociado a múltiples neoplasias malignas tales como: cáncer gástrico (Kim y cols. 2010), cáncer hepático (Li y cols. 2010), cáncer de mama (Karray-Chouayekh y cols. 2009) y cáncer de cabeza y cuello (Steinmman y cols. 2009, Zou y cols. 2009), dentro de los cuales se encuentran los carcinomas de esófago (Wang y cols. 2009, Guo y cols. 2006) y los de cavidad bucal (Czerninski y cols. 2009, Viswanathan y cols. 2003).

1.2.7.3.1 Metilación de genes en cáncer de cabeza y cuello

En los diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello (CCyC) la metilación de la región promotora de diversos genes ha sido reportada como uno de los mecanismos frecuentemente ligado a su inactivación (Cuadro 2). Entre los principales genes se encuentran aquellos que participan en la regulación del ciclo celular como el gen *p16*, que se ha reportado metilado en los tumores de cabeza y cuello en frecuencias que varían del 5

al 88% (De Schutter y cols. 2009, Wang y cols. 2008). Otros genes involucrados en la regulación del ciclo celular son el gen *p14* y el gen *p15*, que se han reportado metilados del 7 al 43% (Guo y cols. 2006, Ishida y cols. 2005) y del 9 al 23%, en los CCyC, respectivamente (Viswanathan y cols. 2003, Ogi y cols. 2002).

Por otra parte, los genes encargados de la reparación del ADN también son inactivados por este mecanismo epigenético. Ejemplo de ello es el gen *MGMT*, el cual se ha encontrado metilado en 23 al 56% de los casos de CCyC (Kato y cols. 2006, Rosas y cols. 2001). La importancia de este gen radica en la reparación del genoma cuando el ADN sufre daños por alquilación, ya que es capaz de eliminar los grupos alquilo localizados en la posición O⁶ de la guanina, lo cual permite mantener la estabilidad genómica (Steinmman y cols. 2009, Rosas y cols. 2001).

1.2.7.3.2 Metilación del gen *hMLHI* en cáncer de cabeza y cuello

Otro importante gen de reparación de ADN que presenta metilación en su promotor es el gen *hMLHI*, perteneciente al sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR). Su silenciamiento por metilación impide eliminar los enlaces base-base erróneos, facilitando la transformación maligna de las células epiteliales, al acumular mutaciones génicas (Fleisher y cols. 2000). Diversos estudios (Zuo y cols. 2009, Sengupta y cols. 2007, Demokan y cols. 2006, Liu y cols. 2003, 2002) han analizado el estado de metilación del gen *hMLHI* en tumores de cabeza y cuello, mostrando una amplia variedad en las frecuencias de metilación de este gen. La frecuencia de metilación del gen *hMLH* en CCyC se ha reportado desde un 32 hasta un 92% (Liu y cols. 2002, Zuo y cols. 2009), para el cáncer de esófago las frecuencias van del 3 al 62% (Tzao y cols. 2005, Wang y cols. 2008).

Son escasos los estudios que han analizado la asociación entre el patrón de metilación del gen *hMLH1* y el cáncer de cavidad bucal, Viswanathan y cols. (2003) reportaron una frecuencia del 8%, por otro lado, Czerninski y cols. (2009) encontraron que el 17% de los casos de cáncer bucal incluidos en su estudio mostraban metilación en el promotor del gen *hMLH1*. Las características de los estudios enfocados al análisis del patrón de metilación del gen *hMLH1* en los diferentes CCyC se muestran en el Cuadro 3.

Viswanathan y cols. (2003) realizó un estudio en el que se incluyeron 99 pacientes con cáncer bucal de la India, para determinar el estado de metilación del gen *HMLH1* se utilizó una enzima de restricción (HpaII), en este estudio no se aportó información sobre las características de los casos incluidos, por otro lado no se analizó la asociación con otras variables. Por su parte, Czerninski y cols. (2009) en Israel, incluyó para su estudio 28 casos de cáncer bucal, sin diferencias en sexo (50% hombres, 50% mujeres), la mayor parte de su población estudiada se encontraban en un rango de edad mayor a los 50 años (24/85%). Mediante el uso de MSP se analizó el estado de metilación de dos genes reparadores de daño al ADN que pertenecen al sistema MMR, el gen *hMLH1* y del gen *hMSH2*, la frecuencia de metilación para ambos genes fue del 50%, de forma individual para el gen *hMLH1* la frecuencia fue del 17%, y para el gen *hMSH2* del 36%, una muestra presentó metilación en ambos genes. Adicionalmente, por inmunohistoquímica, se evaluó la expresión de ambas proteínas, sin embargo, su análisis no permitió que los resultados se presentaran de forma clara. En este estudio, al igual que el anteriormente mencionado, no se realizaron evaluaciones con las condiciones clínico-patológicas de los casos incluidos.

Cuadro 2. Genes frecuentemente metilados en cáncer de cabeza y cuello

Autor/año	p14	p15	p16	APC	E-Caderina	DAPK	MGMT	hMLH1	RAS
Sanchez y col 2000	SD	SD	27%	SD	SD	18%	33%	SD	SD
Rosas y col 2001	SD	SD	47%	SD	SD	33%	23%	SD	SD
Hasegawa y col 2002	SD	SD	32%	SD	36%	24%	SD	SD	SD
Liu y col 2002	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	92%	SD
Ogi y col 2002	14%	9%	29%	SD	SD	7%	SD	SD	SD
Liu y col 2003	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	50%	SD
Viswanathan y col 2003	SD	23%	23%	SD	35%	SD	41%	8%	SD
Kulkarni y col 2004	SD	SD	67%	SD	SD	68%	52%	SD	SD
Wong y col 2004	SD	20%	42%	SD	SD	20%	SD	SD	5%
Ishida y col 2005	43%	SD	74%	SD	SD	SD	26%	SD	SD
Puri y col 2005	SD	SD	36%	SD	SD	SD	30%	23%	SD
Tran y col 2005	SD	SD	63%	SD	SD	SD	SD	SD	93%
Tzao y col 2005	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	62%	SD
Demokan y col 2006	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	47%	SD
Guo y col 2006	7%	17%	50%	14%	31%	24%	36%	33%	SD
Kato y col 2006	SD	SD	51%	SD	SD	SD	56%	SD	SD
Calmon y col 2007	30%	SD	63%	SD	SD	81%	SD	SD	SD
Chen y col 2007	SD	SD	SD	21%	SD	SD	SD	SD	SD
Righini y col 2007	11%	18%	29%	11%	SD	27%	29%	2%	20%
Sengupta y col 2007	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	23%	SD
Wang y col 2008	SD	SD	88%	SD	SD	SD	27%	3%	SD
Czerninski y col 2009	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	17%	SD
De Schutter y col 2009	SD	SD	5%	SD	13%	11%	42%	SD	2%
Ohta y col 2009 ³⁴	SD	SD	64%	SD	SD	SD	SD	SD	SD
Steinmann y col 2009 ³⁵	SD	SD	60%	SD	SD	67%	53%	69%	18%
Wang y col 2009	SD	SD	54%	68%	SD	SD	SD	SD	SD

SD=sin datos

Cuadro 3. Metilación del gen *hMLH1* en tumores de cabeza y cuello

Autor/año	País	Muestras	Casos	H/M	Edad	Tab.	Aic.	Tumor	Nódulos	Etapa clínica	Hx	Met.
Liu /2002	EU	CCyC	13*	---	---	---	---	---	---	---	---	92%
Viswanathan/2003	India	CB	99+	---	---	---	---	---	---	---	---	8%
Liu /2003	EU	CCyC	16*	---	---	---	---	---	---	---	---	50%
Demokan/2006	Turquía	CCyC	116+	88%M	>45 91%	84%	29%	---	N0 73%	III-IV 56%	---	47%
Tzao/2005	China	CE	60*	95%M	---	---	---	T3-4 67%	N0 58%	I-II 65%	---	62%
Guo/2006	China	CE	69*	---	---	---	---	---	---	---	---	33%
Sengupta/2007	India	CCyC	123+	69%M	>50 53%	60%	---	---	---	III-IV 54%	---	23%
Wang/2008	China	CE	125+	65%M	>60 61%	45%	43%	T1-2 54%	N0 53%	---	---	3%
Czerninski/2009	Israel	CB	28*	50%M	>50 85%	---	---	---	---	---	M 82%	17%
Zuo/2009	EU	CCyC	120+	95%M	>65 45%	67%	56%	T1-2 54%	N0 58%	III-IV 60%	---	32%
González/2010¶	México	CB	51+	51%M	>50 84%	51%	45%	T1-2 53%	N0 63%	III-IV 63%	B 92%	74%

*Bloque de parafina, +Tejido fresco, M=Masculino, B=Bien diferenciado, M=Moderadamente diferenciado, HpaII=Enzima de restricción, MSP=PC metilación, ¶Presente estudio, DI=Datos incompletos.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una asociación entre la metilación del promotor del gen *hMLH1* y la falta de expresión de su proteína, con la presencia de CByO, y si existen interacciones con el consumo de tabaco, alcohol e infección por VPH-16?

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien, los antecedentes de consumo de tabaco, alcohol e infección por VPH han sido factores de riesgo altamente asociados con los procesos carcinogénicos de la cavidad bucal y orofaringe, existen reportes de CByO sin la historia de estos factores de riesgo asociada, lo cual propone la búsqueda y el análisis de otras variables que se encuentren participando de forma importante en el desarrollo del CByO.

Los eventos epigenéticos pueden estar jugando un papel importante en el desarrollo del CByO en presencia o ausencia de los factores de riesgo asociados a este tipo de neoplasias. El análisis del estado de metilación en el promotor de un gen reparador de daño al ADN en un grupo de individuos con y sin CByO de la población mexicana, aportaría información importante del papel que desempeñan los procesos epigenéticos en la carcinogénesis de cavidad bucal y orofaringe.

4. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda de posibles biomarcadores que se encuentren relacionados con el desarrollo de CByO, la presente investigación propone analizar el patrón de metilación en el promotor de un gen reparador de ADN, el gen *hMLH1*, que es un gen que participa en el mecanismo de detección de daño al ADN, siendo este evento uno de los primeros mecanismos que se desencadenan durante la carcinogénesis de la cavidad bucal y

orofaringe. Adicionalmente, se propone evaluar si existe una correlación de la metilación del gen *hMLH1* con la falta de expresión de su proteína, así como determinar si existe alguna asociación con los factores de riesgo de consumo de tabaco, alcohol e infección por VPH en el CByO.

Son escasos los estudios sobre cáncer bucal en los que se ha evaluado el estado de metilación de los genes reparadores de daño al ADN, y que hayan determinado la asociación con los factores de riesgo y las características clínico patológicas en un grupo de pacientes con CByO. El gen *hMLH1* es un gen que participa de forma importante en los procesos de reparación de daño al ADN, su función suele verse afectada por dos principales mecanismos: las mutaciones y los eventos epigenéticos. En el CByO, tabaco y alcohol, sus principales factores de riesgo, participan de forma importante en la carcinogénesis de cavidad bucal y orofaringe induciendo daños al ADN, la ineficaz participación del gen *hMLH1* en la reparación de estas alteraciones que se presentan en el ADN se ha asociado con el desarrollo del CByO. Por otro lado, no se ha reportado la presencia de mutaciones en el gen *hMLH1* asociadas con el desarrollo de CByO, por lo cual cobra mayor importancia el identificar si un evento epigenético favorece el silenciamiento de este gen, en presencia o ausencia de los factores de riesgo, y si esta inactivación del gen *hMLH1* se encuentra relacionada con el desarrollo del CByO, lo cual permitiría ampliar el conocimiento sobre la conducta biológica de este tipo de neoplasias.

Los hallazgos de este trabajo permitirán proponer como futuras aplicaciones el uso de la terapia epigenética en los casos de CByO que presenten metilación del gen *hMLH1*,

aunado al probable factor pronóstico que el estado de metilación pudiera representar en el CByO.

El presente proyecto permitirá continuar con la línea de investigación relacionada con biomarcadores y cáncer bucal, que se ha desarrollado en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X) con la colaboración del INCan.

5. HIPÓTESIS

La metilación en el promotor del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína, se asocia con la presencia de cáncer bucal y orofaríngeo, así como con los factores de riesgo: tabaco, alcohol y VPH.

6. OBJETIVO GENERAL

Estimar la asociación de la metilación en el promotor del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína con la presencia de CByO y su posible relación con la infección por VPH-16 y el consumo de tabaco y alcohol.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar el estado de metilación en el promotor del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína en CByO.
- Estimar la asociación de la metilación del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína con la etapa clínica del CByO.
- Estimar la asociación de la metilación del gen *hMLH1* y la expresión de su proteína con el CByO y con el consumo de tabaco, alcohol e infección por VPH.
- Estimar la asociación del tabaco y alcohol con el CByO.

- Estimar la asociación de la infección con VPH con la presencia de CByO.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Estudio de casos y controles pareado por edad y sexo, que se desarrolló en un período de dos años, con la participación del Departamento de Cabeza y Cuello del INCan, el Laboratorio de Histopatología de la UAM-X, el Laboratorio de Toxicología Ambiental del INCan, el Departamento de Oftalmología del Hospital “Dr. Manuel Gea González” y la Clínica Estomatológica “Rafael Lozano” de la UAM-X.

Para el propósito del presente estudio y con base en la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1992) se utilizó el término de cáncer bucal para referirse al carcinoma escamocelular localizado en la mucosa bucal (mucosa yugal y mucosa labial), el piso de boca, los dos tercios anteriores de la lengua (dorso y bordes laterales), el paladar duro y el proceso alveolar (C01-C06). El término de cáncer orofaríngeo se utilizó para el carcinoma escamocelular localizado en la fosa amigdalina y pilar amigdalino anterior y posterior (C09).

7.2 Sujetos participantes

7.2.1 Criterios de inclusión de los casos

- Pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico histológico de CByO primario, que no hayan recibido tratamiento médico previo (cirugía, quimioterapia o radioterapia).
- Que acepten participar en el estudio, mediante la firma de carta consentimiento.

7.2.2 Criterios de exclusión de los casos

- Pacientes con CByO que hayan sido tratados (cirugía, radio o quimioterapia).
- Pacientes con neoplasias malignas de glándulas salivales, melanoma, linfoma o sarcoma bucal.
- Pacientes con otras neoplasias malignas que no correspondan a cabeza y cuello.

7.2.3 Criterios de inclusión de los controles

- Individuos mayores de 18 años, sin CByO, pareados por edad (considerando ± 5 años) y sexo con los casos.
- Que acepten participar en el estudio, mediante la firma de carta consentimiento.

7.2.4 Criterios de exclusión de los controles

- Individuos con neoplasias malignas o historia de ellas.
- Individuos con desórdenes potencialmente malignos.
- Individuos con alteraciones sistémicas que afecten la respuesta inmune.

Los casos contarán con cuatro controles cada uno y serán seleccionados de dos fuentes diferentes:

1. Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Se incluyeron a los pacientes del Servicio de Oftalmología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, se seleccionó este servicio, debido a que brinda atención médica a personas con un nivel socio-económico comparable al de los pacientes que acuden al

INCan y que pertenecen al grupo de población no derechohabiente, además, en dichos servicios, se atiende a individuos adultos con edades similares a las de los casos y que en general, no tienen afecciones sistémicas.

2. Clínica Estomatológica “Rafael Lozano” de la UAM-X.

Se incluyeron a los pacientes que acuden a esta clínica estomatológica para solicitar atención dental, ya que los pacientes que solicitan servicio dental en esta clínica generalmente pertenecen al grupo de personas sin seguridad social y son semejantes en condición socioeconómica al grupo de los casos. Es importante mencionar que estos pacientes acuden por alteraciones dentales y generalmente no presentan padecimientos sistémicos de importancia.

Al incorporar un segundo grupo control, con individuos sin afecciones sistémicas que representan a la comunidad de una zona cercana al INCan, se pretende disminuir el sesgo de selección que implica incluir controles hospitalarios.

7.3 Variables

Las variables consideradas fueron:

Variable dependiente: metilación del gen *hMLH1*.

Variables independientes: edad, género, antecedentes familiares de cáncer, consumo de tabaco y alcohol, cáncer bucal y orofaríngeo, características clínicas y localización del CByO, etapa clínica del paciente, de acuerdo al American Joint Comitee on Cancer (AJCC), grado histológico del CByO, presencia de VPH, y expresión la proteína hMLH1.

7.3.1 Criterios operacionales

Consumo de tabaco: Para el análisis del consumo de tabaco se clasificó a los pacientes en tres categorías, 1) No fumadores (aquellos que nunca han fumado regularmente), 2) Fumadores (individuos que han fumado por lo menos 1 cigarrillo por día durante el último año), y 3) Ex-fumadores (individuos que por lo menos hayan fumado un cigarrillo al día durante un año y que no han fumado en el último año) (SS, ENA 2003). Se registró también si se utilizaban cigarrillos con o sin filtro. Para los pacientes fumadores y ex-fumadores, se registró la edad de inicio del hábito y se calculó el tiempo durante el cual han mantenido el hábito (meses). Posteriormente, se calculó el número de paquetes (20 cigarrillos por paquete) que consumió por año y se calculó el total de cigarrillos.

Consumo de alcohol: Se cuantificó en unidades de bebida (UB) la cantidad de alcohol que se ingirió por semana, de acuerdo al tipo de bebida que fue consumida, y tomando en cuenta el contenido de etanol de cada una de ellas: una UB fue considerada dependiendo del tipo de alcohol y la cantidad en ml consumidos: para tequila, ron, mezcal, licor y brandy la cantidad promedio de consumo por UB fue de 30 ml, para vino de 125 ml, y para cerveza y pulque de 130 ml.

Se clasificó a los pacientes en tres categorías: 1) No bebedores (aquellos que no toman alcohol o que toman menos de una copa por semana), 2) Bebedores (individuos que han ingerido más de una copa a la semana por un año), y 3) Ex-bebedores (individuos que no han ingerido mas de una copa por semana durante el año previo al examen bucal) (SS, ENA 2003). El grupo de ex-bebedores que refieran más de 10 años sin el hábito, fueron re-clasificados como no bebedores. Para los fines del análisis estadístico las categorías de

fumador y exfumador fueron agrupadas como hábito positivo, de igual forma para las categorías de bebedor y exbebedor.

7.3.2 Ficha de recolección de datos

Ficha para los casos (Ficha 1 casos)

Ficha para los controles (Ficha 2 controles)

7.4 Análisis estadístico

Para describir las características de los casos y los controles, se analizaron las variables mediante medidas de tendencia central y de dispersión. Para la comparación entre variables se utilizaron las pruebas de χ^2 y exacta de Fisher, según aplicaba en cada caso. Con un modelo de regresión logística condicional se estimó la asociación entre la presencia de CByO y los factores de riesgo, así como la razón de momios y sus intervalos de confianza al 95%.

7.4.1 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculó considerando un diseño de casos y controles pareado, cuatro a uno, para un nivel de confianza del 95% y un poder $(1-\beta)$ del 80%, suponiendo una prevalencia de metilación en los controles del 15% y del doble en los casos con CByO.

7.5. Procedimientos clínicos

En los pacientes con CByO, que acudieron por primera vez al servicio de cabeza y cuello del INCan, se realizó un interrogatorio para obtener una ficha de identificación que

contenía datos socioeconómicos, antecedentes heredo-familiares, características clínicas de la lesión (color, textura, apariencia, extensión, tamaño y localización), con los que se realizó la estadificación de acuerdo a criterios establecidos por el AJCC, sintomatología asociada al padecimiento, fecha de inicio y tiempo transcurrido para la obtención del diagnóstico, historia de consumo de tabaco y alcohol. Para los controles sólo se registraron datos socioeconómicos, antecedentes heredo-familiares, historia de consumo de tabaco y alcohol.

Se realizó un examen bucal, tanto para los casos como para los controles, registrando en la ficha de identificación las lesiones bucales que se encontraron presentes, en el Anexo de zonas anatómicas se enlistan los puntos a considerar en la exploración bucal.

La obtención de ADN en los casos, se realizó mediante tres cepillados citológicos de la mucosa bucal, de la zona más representativa de la lesión, por medio de un cepillo citológico estéril de nylon, que posteriormente fue introducido en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml con 8 ml de un preservador celular comercial (*Precervcyt*, Cytoc Corporation, USA). En los controles la obtención de ADN se realizó mediante tres cepillados citológicos de la mucosa bucal, de una zona topográfica equivalente a la del individuo afectado (caso), por medio de un cepillo citológico de nylon estéril, que posteriormente fue introducido en un tubo con 8 ml de *Precervcyt*. Adicionalmente, en los casos se tomó una biopsia, tratando de que la toma fuera durante el procedimiento quirúrgico para el diagnóstico confirmatorio.

El tejido obtenido de la biopsia fue dividido en dos partes, una parte fue utilizada para la confirmación del diagnóstico y para evaluar que más del 90% de la muestra incluida correspondiera a células tumorales, la otra sección se congeló a -20°C y fue almacenada, para los estudios moleculares posteriores. Las biopsias obtenidas fueron procesadas en el laboratorio de Histopatología del INCan y en el laboratorio de Histopatología de la UAM-X. Los diagnósticos histopatológicos fueron realizados por un patólogo del Departamento de Patología General del INCan y corroborados por dos patólogas bucales de la UAM-X.

7.6 Procedimientos de laboratorio

7.6.1 Extracción y purificación de ADN

Todas las soluciones utilizadas en los siguientes procedimientos fueron soluciones de grado biología molecular (libres de ADNasas y ARNasas), adicionalmente, para la extracción y purificación de ADN se utilizó el kit comercial de Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit- Promega.

Cepillado citológico (casos y controles): El tubo cónico de 15 ml con las muestras citológicas fue colocado en un vórtex (Bio-Rad BR-2000) durante 10 segundos, para separar el material obtenido del cepillo citológico y retirarlo, posteriormente el tubo fue colocado en una centrifuga (Beckman GPR centrifuge rotor GH 3.7) durante 5 minutos a 1,300 g, se desechó el sobrenadante y se invirtieron los tubos sobre papel secante durante toda la noche, para el completo secado de la pastilla celular obtenida, posteriormente se agregaron al tubo 400 µl de buffer de lisis nuclear (incluido en el kit) y se traspasó la muestra a un microtubo de 1.5 µl.

Muestras tisulares de CByO: Se colocaron 20 mg de tejido en un microtubo de 1.5 µl con 400 µl de buffer de lisis nuclear (incluido en el kit), se trituró el tejido mediante un homogenizador de tejidos (OMNI Tissue homogenizer-TH), posteriormente ambas muestras (citológicas y tisulares) fueron aforadas a 600 µl con el buffer de lisis nuclear, las muestras se colocaron en el vórtex (Bio-Rad BR-2000) por algunos segundos y se incubaron a 65°C durante 30 minutos, para posteriormente dejarlas en reposo a temperatura ambiente. A las muestras se agregaron 3 µl de solución ARNasa (de un stock de 20 mg/ml) (Invitrogen®) y fueron incubadas a 37° C durante 30 minutos, posteriormente se añadieron 20 µl de proteinasa k (de un stock de 20 mg/ml) (GibcoBRL®) y se incubaron a 65° C en un termoblock durante 1 hora. Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de solución precipitadora de proteínas (incluida en el kit), se colocaron en el vórtex por algunos segundos y se incubaron en una cubeta con hielo por 5 minutos. Posteriormente se colocaron en una centrifuga (Biofuge *fresco* Heraeus–Sorvall® rotor de 24 plazas) por 5 minutos a 16,000 g, el sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio de 1.5 µl y se agregaron 600 µl de isopropanol al 100%, se invirtió el tubo varias veces y se colocaron las muestras en la centrifuga por 15 minutos a 16,000 g, se desechó el sobrenadante, se agregaron 600 µl de etanol al 70%, se invirtió varias veces el tubo y nuevamente se colocaron las muestras en la centrifuga por 15 minutos a 16,000 g. Con el uso de una bomba de vacío se aspiró el etanol utilizando una punta para pipeta, se destaparon los tubos y se invirtieron sobre papel secante limpio hasta que se secan por completo. Finalmente, se añadieron 100 µl de solución rehidratante de ADN (incluida en el kit) y se incubaron las muestras a 65° C por una hora. Todas las muestras obtenidas fueron cuantificadas en un fotoespectrómetro (Bekman DU 650) utilizando una dilución 1:200,

finalmente las muestras del ADN obtenido fueron almacenadas a -20°C para los análisis posteriores.

Se realizó la extracción y purificación ADN de todas las muestras incluidas en el estudio (biopsias y cepillados citológicos): 51 muestras de tejido de CByO, 153 cepillados citológicos de casos de CByO (3 por caso) y 612 cepillados citológicos de 204 controles (3 cepillados por control).

7.6.2 Reacciones de PCR

Para la realización de las reacciones de PCR que a continuación se describen, se utilizó el ADN de las muestras incluidas con una concentración de $100\text{ ng}/\mu\text{l}$, adicionalmente, se realizó la cosecha y extracción de ADN de diversas líneas celulares, que fueron utilizadas como controles positivos para dichos procedimientos.

Los oligonucleótidos utilizados se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados y producto esperado.

Gen	Secuencias	Producto
β globina		
GH20	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'	
PC04	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'	260 pb
hMLH1 metilado		
sentido	5'-GGAGTGAAGGAGGTTACGGGTAAGT-3'	
antisentido	5'-AAAAACGATAAAACCCTATACCTAATCTATC-3'	184 pb
hMLH1 no metilado		
sentido	5'-TTT TGA TGT AGA TGT TTT ATT AGG GTT GT-3'	
antisentido	5'-ACA CCT CAT CAT AAC TAC CCA CA-3'	124 pb
MY09/MY11		
MY09	5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3'	
MY11	5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GC-3'	450 pb
GP5+/GP6+		
sentido	5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3'	
antisentido	5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GC-3'	150 pb
PGMY		
sentido	5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3'	
antisentido	5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GC-3'	450 pb
E6VPH-16		
F046	5' TTG AAC CGA AAC CGG TTA GT	
R590	5' TCA TGC AAT GTA GGT GTA TCT CC3'	500 pb

7.6.2.1 Amplificación del gen β globina

Para verificar la integridad del ADN obtenido, todas las muestras fueron sometidas a la amplificación de un fragmento del gen β -globina, que es un gen altamente conservado en las células humanas, utilizando un par de oligonucleótidos previamente descritos (Saiki y cols. 1985).

La reacción de PCR para la amplificación del gen β -globina se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l, la cual contenía: 3 μ l de buffer 10X, $MgCl_2$ 3 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos GH20 y PC04 10 pmol, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/ μ l, se aforo con agua y 2 μ l de ADN de las muestras obtenidas.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 7 minutos necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 40 ciclos a 94° C por 30 segundos (desnaturalización), a 55° C por 30 segundos (alineación), a 72° C por 45 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final).

Para la reacción de PCR descrita se utilizaron sistemáticamente los siguientes controles: ADN de la línea celular CaSki, proveniente de cáncer de cérvix VPH-16 como control positivo y el control de reactivos de PCR sin ADN.

El gen β globina se logró amplificar en todas las muestras incluidas en el estudio (muestras tisulares y cepillados citológicos).

7.6.2.2 Análisis del patrón de metilación del gen *hMLHI*

Para determinar el estado de metilación del gen *hMLHI* en todas las muestras se realizó un PCR específico para metilación (MSP), previa modificación con bisulfito de sodio.

7.6.2.2.1 Modificación del ADN con bisulfito de sodio

La modificación del ADN fue realizada utilizando el siguiente kit comercial: EZ ADN Methylation Kit™ (ZYMO-RESEARCH cat D5001). En un microtubo de 1.5 μ l se colocaron 3 μ g de ADN, 10 μ l de buffer de dilución-M (incluido en el kit) y se aforó con agua estéril a 50 μ l. Se incubó la muestra en un termoblock (Dri-block DB-2^a) a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 150 μ l de reactivo de conversión CT (incluido en el kit), se agitó la muestra, se incubó en condiciones de oscuridad a 50 °C por 24 horas y se colocó en una cubeta con hielo por 10 minutos. Para desulfonar la muestra, se utilizó una columna (incluida en el kit), con la cual se minimizó la pérdida de ADN durante el tratamiento de limpieza. En la columna soportada por un tubo colector de 2 ml, se

colocaron los 200 μ l de la muestra, previamente trabajada, se adicionaron 600 μ l de buffer de unión M (incluido en el kit), se colocaron las muestras en un centrifuga (Biofuge *fresco* Heraeus–Sorvall® de 24 plazas) por 1 minuto a 16,000 g, y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 200 μ l de buffer de lavado (incluido en el kit) a la columna y se centrifugó la muestra durante 1 minuto a 16,000 g. Se colocaron 300 μ l de buffer de desulfonación M (incluido en el kit) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar por 1 minuto a 16,000 g. Se colocaron 200 μ l de buffer de lavado y se centrifugó durante 1 minuto a 16,000 g, se realizó un segundo lavado con 200 μ l de buffer de lavado, se centrifugó durante 1 minuto y se eliminó el contenido del tubo colector. Finalmente, se adicionaron 10 μ l de buffer de elusión (incluido en el kit) y se centrifugó por 1 minuto a 16,000 g, la muestra obtenida en el tubo colector correspondió al ADN modificado con el cual se procedió a realizar el MSP.

7.6.2.3 PCR específico para metilación (MSP)

La amplificación del ADN modificado fue realizada utilizando un juego de oligonucleótidos para un fragmento de región metilada y otro juego para la región no metilada, descritos previamente (Fleisher y cols. 2000).

hMLH1 no metilado. La reacción de PCR para la región no metilada se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, la cual contenía: 2 μ l de buffer 10X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (AS) 10 μ M, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/ μ l, se aforo con agua y finalmente se agregaron 3 μ l del ADN modificado.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 12 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 35 ciclos a 94° C por 35 segundos (desnaturalización), a 57° C por 35 segundos (alineación), a 72° C por 45 segundos (extensión) y un último ciclo a 72° C por 7 minutos (extensión final).

hMLH1 metilado. La reacción de PCR para la región metilada se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, la cual contenía: 2.5 µl de buffer 10X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos para *hMLH1* metilado (sentido-antisentido) 10 µM, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/µl, se aforo con agua y se agregaron 3 µl del ADN modificado.

Las reacciones de MSP fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 95° C por 12 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 35 ciclos a 94.5° C por 30 segundos (desnaturalización), a 59° C por 30 segundos (alineación), a 72° C por 60 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final).

Para las reacciones de MSP descritas se utilizaron sistemáticamente los siguientes controles: ADN de la línea celular SW48, proveniente de cáncer de colon y descrita como metilada para el gen *hMLH1* (Deng y cols. 1999) y el control de reactivos de PCR sin ADN.

7.6.2.4 Amplificación de VPH

Para determinar la presencia del VPH en las muestras incluidas se utilizaron cuatro juegos de oligonucleótidos: primeramente se utilizaron los oligonucleótidos universales

MY09/MY11, que se encuentran localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH, que incluye los nucleótidos 6722 al 7170 del VPH-16, y las regiones correspondientes a otros tipos virales. Estos oligonucleótidos son capaces de detectar más de 25 tipos virales del VPH, amplificando un fragmento aproximadamente de 450 pb (Manos y cols. 1989).

La reacción de PCR para MY09/MY11 se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l, la cual contenía: 3 μ l de buffer 10X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos MY09 y MY11 10 pmol, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/ μ l, se aforo con agua y colocaron 2 μ l de ADN.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 7 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 40 ciclos a 94° C por 30 segundos (desnaturalización), a 55° C por 30 segundos (alineación) a 72° C por 45 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final).

Posteriormente se utilizaron los oligonucleótidos GP5+/GP6+ localizados dentro de la secuencia reconocida por los oligonucleótidos MY09/MY11 que pueden detectar los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 32 del VPH (de Roda y cols. 1995). Para esta determinación la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, la cual contenía: 6 μ l de buffer 10X, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos GP5+ y GP6+ 10 pmol, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/ μ l, se aforo con agua y agregaron 2 μ l de ADN.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 7 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 40

ciclos a 94° C por 30 segundos (desnaturalización), a 48° C por 30 segundos (alineación), a 72° C por 45 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final).

Adicionalmente, se utilizaron los oligonucleótidos PGMY, localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH (Coutlée y cols. 2002). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl, la cual contenía: 3 µl de buffer 10X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos PGMY(S) y PGMY(AS) 10 pmol, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/µl, se aforo con agua y finalmente se agregaron 2 µl de ADN.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 7 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 40 ciclos a 94° C por 30 segundos (desnaturalización), a 55° C por 30 segundos (alineación), a 72° C por 45 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final).

Finalmente, se utilizaron los oligonucleótidos para el Gen E6 del VPH-16. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl, la cual contenía: 3 µl de buffer 10X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos F046 y AR590 10 pmol, Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*) 1.5 u/µl, se aforo con agua y se agregaron 2 µl del ADN.

Las reacciones de PCR fueron programadas de la siguiente manera: Un ciclo a 94° C por 7 minutos, necesario para la activación de la Taq polimerasa, posteriormente: 40 ciclos a 94° C por 30 segundos (desnaturalización), a 50° C por 30 segundos (alineación), a 72° C por 45 segundos (extensión) y un ciclo final a 72° C por 7 minutos (extensión final). En las reacciones de PCR descritas para la determinación de la presencia de VPH se utilizaron sistemáticamente los siguientes controles: ADN de la línea celular CaSki, proveniente de cáncer de cérvix VPH-16 y el control de reactivos de PCR sin ADN.

Los productos de PCR de las reacciones descritas fueron examinados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 1 μ l de bromuro de etidio [10 mg/ml), utilizando 5 μ l [0.5 μ g] de un marcador de tamaño de 100 pb de un stock de 0.1 μ g/ μ l (TrackIt™ 100 bp ADN ladder-Invotrogen™), se cargaron 4 μ l de la reacción de PCR con 1 μ l de buffer de carga [2X] (10X BlueJuice™ Gel loading Buffer- Invotrogen™) por carril, y se corrió el gel en una cámara de electroforesis horizontal (Horizon® 58) a 100 voltios por 45 minutos aproximadamente, y finalmente el gel fue visualizado mediante luz UV en un fotodocumentador (El Logic 200. System Imaging Kodak).

7.6.3 Análisis de expresión de la proteína hMLH1

7.6.3.1 Inmunohistoquímica

El análisis de la expresión de la proteína hMLH1 se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se realizaron cortes histológicos de 2 a 3 μ m y se colocaron en laminillas con poli-lisina que fueron colocadas en una estufa por 30 minutos a 60° para fundir la parafina de las muestras. La hidratación de las muestras se inició eliminando la parafina restante introduciendo las muestras en xilol, primero por 5 minutos y después por 30 segundos, posteriormente se terminó la hidratación introduciendo las muestras en alcohol anhidro absoluto, luego a 96, 80, 70, 50% respectivamente, y finalmente en agua destilada.

Para realizar el desenmascaramiento de epítopes, se colocaron las muestras en un vaso de coplin de polipropileno de alta densidad con citrato de sodio pH 6.0 (Antigen retrieval citra plus 1X BioGenex®). Se realizó un precalentamiento por 5 minutos de la olla express para microondas, posteriormente se colocó el vaso de coplin con las muestras y se reprogramó el microondas por 5 minutos más, se dejaron enfriar las muestras a temperatura

ambiente y se lavaron las muestras con dos baños de agua destilada, se incubaron las muestras con peróxido de hidrógeno al 0.9% por 5 minutos, se lavaron con PBST1X por 4 minutos y se colocaron 100 µl del anticuerpo primario anti MLH1 (Purified mouse anti-MLH1 monoclonal antibody-BD Pharmingen™) dilución 1:50 en PBST1X, se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos y se lavaron las muestras con PBST. Posteriormente, se colocaron 100 µl del polímero MACH4 Mouse (HRP-Polymer Biocare Medical MHRP520L) y se incubaron las muestras por 25 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las muestras con PBST1X, y se colocaron 100 µl del polímero MACH4 Mouse/Rabbit (HRP-Polymer Biocare Medical MHRP520L) y se incubaron las muestras por 25 minutos a temperatura ambiente, finalmente se lavaron las muestras con PBST1X.

Para el revelado de las muestras se colocaron 40 µl de cromógeno (Inmunodetector 3'3 diaminobencidina (DAB) cromógeno Bio SB®) en 1 ml de buffer mouse/rabbit (DAB polidetector Bio SB®), se monitorearon las muestras al microscopio hasta observar reacción positiva en el tejido control (hiperplasia fibrosa de mucosa bucal), posteriormente se lavaron las muestras con agua corriente y fueron teñidas con hematoxilina de Gill virada con hidróxido de amonio (0.37 M), finalmente se deshidrataron las muestras realizándose baños que fueron desde agua destilada hasta alcohol absoluto.

7.6.3.2. Conteo de expresión celular de la proteína hMLH1

El porcentaje de células positivas fue realizado con base en un estudio previo (Bologna-Molina y cols. 2008). De cada laminilla fueron seleccionados 5 campos al azar; se tomó una microfotografía de cada campo (amplificación 400x), posteriormente se colocó sobre cada microfotografía una gradilla con 20 celdillas para realizar el conteo por

celdilla de las células neoplásicas positivas a la tinción de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti hMLH1. Para el conteo de expresión celular se realizó la suma total de los 5 campos, obteniéndose el porcentaje total de la expresión de la proteína hMLH1 en cada uno de los casos (células neoplásicas positivas/total de células neoplásicas = porcentaje total de expresión de la proteína hMLH1). Se consideró únicamente la positividad de los núcleos celulares, la presencia del infiltrado inflamatorio no fue considerada para este fin.

8. RESULTADOS

Durante el periodo de diciembre 2007 a diciembre 2009 se incluyeron 250 sujetos en el presente estudio, 51 pacientes con CByO, (51% hombres y 49% mujeres) con una mediana de edad de 65 (Q₁-Q₃ 55-70) años, y 204 controles con una mediana de edad de 63 (Q₁-Q₃ 54-70) años.

8.1 Características demográficas y clínicas

Las características demográficas y clínicas de los casos y los controles se muestran en el Cuadro 5, debido a que se trata de un estudio pareado por edad y género no se observaron diferencias entre los grupos.

Las características de los 51 casos de CByO se detallan en el Cuadro 6. La zona anatómica más afectada por cáncer bucal fue el borde lateral de lengua en 31 (61%) de los pacientes, en 18 de estos casos solo fue afectado el borde lateral de la lengua, en 8 casos existía compromisos hacia base de lengua y en 5 hacia piso de boca. La encía fue el segundo sitio frecuentemente afectado, observándose en 16 (31%) de los casos; 13 casos afectando la encía inferior y tres casos en la encía superior. La orofaringe fue afectada únicamente por un caso localizado en la amígdala. Referente a las etapas clínicas en 32

(63%) de los casos fueron diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad (EC III-IV). La mayor parte de los casos (92%) fueron clasificados histológicamente como bien diferenciados.

8.2 Asociación de factores de riesgo con CByO

El consumo de tabaco y alcohol fueron los factores de riesgo mas fuertemente asociados con la presencia de CByO, el uso de tabaco fue registrado en 26 (51%) de los casos en contraste con 43 (22%) de los controles ($p=0.037$), por otro lado, el consumo de alcohol se reportó en 23 (45%) de los casos y en 30 (15%) de los controles ($p=0.046$). Adicionalmente, también se encontró asociación entre la historia familiar de cáncer y la presencia de CByO (49% vs 25% $p=0.001$).

Los resultados del análisis de regresión logística condicional se muestran en el Cuadro 7, en el cual se observa que los valores de las RM crudas muestran que los factores de riesgo: tabaco, alcohol e historia familiar de cáncer se encuentran asociados con la presencia de CByO. Por otro lado, de acuerdo a las RM ajustadas por tabaco, alcohol e historia familiar de cáncer los individuos con estos factores de riesgo presentan un riesgo mayor de presentar CByO (2.60, 3.34 y 2.45, respectivamente), con significancia estadística solo para alcohol e historia familiar de cáncer.

8.3 Análisis del promotor del gen *hMLH1*

Todas las muestras incluidas (casos y controles) fueron sometidas al análisis del promotor del gen *hMLH1*, de las 51 muestras de los casos, 38 (74%) mostraron metilación del promotor del gen *hMLH1*; por otro lado, ninguna de las muestras de los controles

mostró metilación en el promotor del gen *hMLH1*. En la Figura 5 se observan muestras representativas con resultados del análisis por MSP para el gen *hMLH1*.

En el presente estudio se observó que un alto porcentaje de las muestras de los casos con metilación en el promotor del *hMLH1* correspondían al sexo femenino (23/60%), en comparación con el género masculino (15/40%) ($p=0.018$). No se observaron diferencias entre el estado de metilación y el uso de tabaco ($p=0.199$), consumo de alcohol ($p=0.207$), historia familiar de cáncer ($p=0.349$) y grado histológico ($p=0.561$). Por otro lado, en lo que respecta al tamaño de las lesiones, 24 (63%) de los casos metilados correspondían a tumores T1 y T2, en contraste con los casos no metilados, donde 10 (77%) fueron categorizados como T3 y T4 ($p=0.023$). En las muestras no metiladas se registró que 12 (92%) se encontraban en etapas clínicas avanzadas de la enfermedad ($p=0.018$) (Cuadro 8).

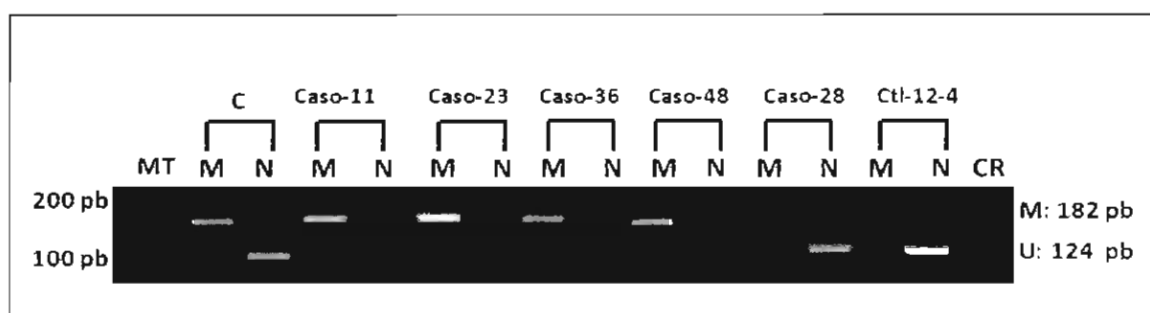


Figura 5. Muestras representativas de resultados de MSP para el gen *hMLH1* en muestras de casos y controles. Las líneas M y N corresponden a metilado y no metilado, respectivamente. C- controles de líneas celulares SW48 para metilado y MCF7 para no metilado. CR-control de reactivos de PCR, sin ADN.

8.4 Expresión de la proteína *hMLH1*

La falta de expresión de la proteína *hMLH1* fue observada en 12 (23%) de los casos de CByO. Como se muestra en el Cuadro 9 no se observaron diferencias significativas entre la expresión de la proteína y el uso de tabaco ($p=0.324$), el consumo de alcohol ($p=0.336$),

la historia familiar de cáncer ($p=0.324$) y el grado histológico ($p=1.000$). Respecto al tamaño del tumor, todas las muestras negativas a la expresión de la proteína correspondían a la clasificación T1-T2 ($p<0.0001$). Por otro lado, la ausencia de expresión de la proteína sólo fue observada en las etapas clínicas tempranas de la enfermedad, (EC I y II) ($p<0.0001$).

Como se muestra en la Figura 6 la expresión de la proteína hMLH1 es predominantemente nuclear. En los casos positivos se observó que las células neoplásicas presentaban un intenso marcaje nuclear.

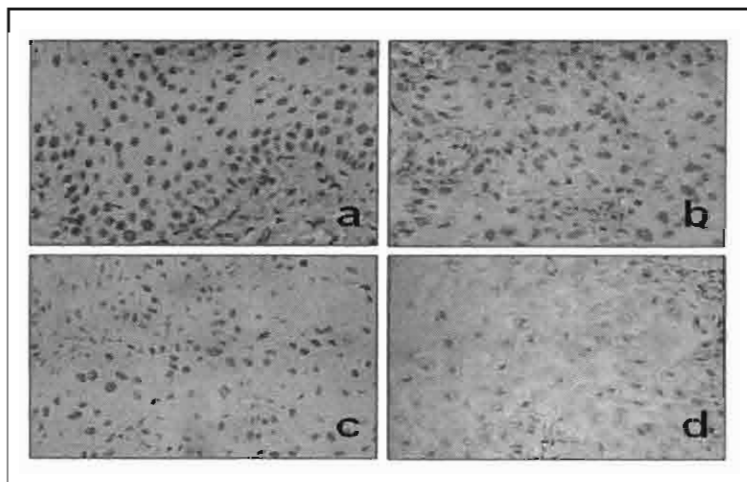


Figura 6. Tinción de inmunohistoquímica para hMLH1. (a) Control positivo, hiperplasia fibrosa que muestra tinción nuclear intensa en las células epiteliales (400x). (b, c) Células neoplásicas de carcinoma bucal con expresión nuclear positiva (400x). (d) Expresión negativa de células neoplásicas de cáncer bucal (400x).

Con respecto al conteo celular, la mediana del porcentaje de células neoplásicas positivas fue significativamente mas alta en los casos bien diferenciados en comparación con los moderada y pobremente diferenciados ($p=0.004$). No se observaron diferencias

significativas entre el porcentaje de células positivas y el estado de metilación ($p=0.815$) (Cuadro 10).

En el Cuadro 11 se muestran los resultados del análisis de regresión logística múltiple, observándose que al realizar el ajuste por sexo y uso de tabaco se obtuvo una RM de 19.11 con un IC 95% 1.88-193.63, ($p=0.013$) para metilación del *hMLH1* y la ausencia de expresión de la proteína en etapas clínicas tempranas de la enfermedad.

8.5 Determinación de la infección por VPH en CByO

La presencia de VPH únicamente fue observada en un caso de cáncer de orofaringe, lo cual representó el 2% del total de las muestras incluidas, se determinó que este correspondía a VPH de alto riesgo, resultando positivo al gen E6 del VPH-16. En los controles la prevalencia de VPH fue del 0.5% (1/2004), que de igual forma que el caso, fue VPH-16.

Cuadro 5. Características clínico-demográficas de los casos y controles

	Casos (n=51)		Controles (n=204)		* <i>p</i>
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Masculino	26	(51)	104	(51)	
Femenino	25	(49)	100	(49)	1.00
Mediana de edad (años)	65 (27-85)		63 (25-88)		
Tabaco					
No fumador	25	(49)	161	(78)	
Fumador	26	(51)	43	(22)	0.037
Alcohol					
No bebedor	28	(55)	174	(85)	
Bebedor	23	(45)	30	(15)	0.046
Historia familiar de cáncer					
Negativo	26	(51)	154	(75)	
Positivo	25	(49)	50	(25)	0.001

**p*= χ^2

Cuadro 6. Características clínico-patológicas de 51 casos de cáncer bucal y orofaríngeo

	n	(%)
Localización		
Lengua (borde lateral)	31	(61)
Encía	16	(31)
Paladar	2	(4)
Mucosa bucal	1	(2)
Amígdala	1	(2)
Nódulos		
N0	32	(63)
N1	19	(37)
Tamaño		
T1/2 (< 2-4 cm)	27	(53)
T3/4 (> 4 cm)	24	(47)
Etapa clínica		
I/II (Temprana)	19	(37)
III/IV (Avanzada)	32	(63)
Grado histológico		
Bien diferenciado	47	(92)
Moderada y pobremente diferenciado	4	(8)

Cuadro 7. Razón de momios e intervalos de confianza 95% para cáncer bucal y orofaríngeo

	RM Crudas (95% IC)	<i>p</i>	RM Ajustadas* (95% IC)	<i>p</i>
Tabaco				
No	1.00			
Si	5.66 (2.48-12.92)	<0.0001	2.60 (0.95-7.08)	0.060
Alcohol				
No	1.00			
Si	7.75 (3.21-18.72)	<0.0001	3.34 (1.16-9.58)	0.025
Historia familiar de cáncer				
Negativa	1.00			
Positiva	3.32(1.69-6.52)	<0.0001	2.45 (1.16 -5.18)	0.019

*Ajustada por tabaco, alcohol e historia familiar de cáncer.

Cuadro 8. Factores de riesgo y características clínico-patológicas de acuerdo con el estado de metilación del gen *hMLH1* en cáncer bucal y orofaríngeo

	Metilado (n=38)		No metilado (n=13)		<i>p</i> *
	n	(%)	n	(%)	
Tabaco					
No	21	(55)	4	(31)	0.199
Si	17	(45)	9	(69)	
Alcohol					
No	23	(60)	5	(38)	0.207
Si	15	(40)	8	(62)	
Historia familiar de cáncer					
Negativa	21	(55)	5	(38)	0.349
Positiva	17	(45)	8	(62)	
Grado histológico					
Bien diferenciado	34	(89)	13	(100)	0.561
Moderado/pobremente diferenciado	4	(11)	0	(0)	
Tamaño de tumor					
T1/2 (< 2-4 cm)	24	(63)	3	(23)	0.023
T3/4 (> 4 cm)	14	(37)	10	(77)	
Etapa clínica					
I/II (temprana)	18	(47)	1	(8)	0.018
III/IV (avanzada)	20	(53)	12	(92)	
Expresión de proteína					
Negativa	12	(32)	0	(0)	0.023
Positiva	26	(68)	13	(100)	

Cuadro 9. Factores de riesgo y características clínico-patológicas de acuerdo con la expresión de la proteína hMLH1 en cáncer bucal y orofaríngeo

	Positiva (n=39)		Negativa (n=12)		<i>p</i> *
	n	(%)	n	(%)	
Tabaco					
No	21	(54)	4	(33)	0.324
Si	18	(46)	8	(67)	
Alcohol					
No	23	(59)	5	(42)	0.336
Si	16	(41)	7	(58)	
Historia familiar de cáncer					
Negativa	18	(46)	8	(67)	0.324
Positiva	21	(54)	4	(33)	
Grado histológico					
Bien diferenciado	36	(92)	11	(92)	1.000
Moderada y pobremente diferenciado	3	(8)	1	(8)	
Tamaño tumor					
T1/2 (< 2-4 cm)	15	(38)	12	(100)	<0.0001
T3/4 (> 4 cm)	24	(62)	0	(0)	
Etapas clínicas					
I/II (temprana)	7	(18)	12	(100)	<0.0001
III/IV (avanzada)	32	(82)	0	(0)	

Cuadro 10. Diferencias en la expresión de la proteína de acuerdo al grado histológico en CByO

Grado histológico	n=	Expresión de hMLH1 (%)		<i>p</i>
		Media + DS	Mediana (Min-Max)	
Bien diferenciado	34	83.6 ± 7.1	84.2 (63.9-94.3)	0.004
Moderado/pobrementemente diferenciado	4	59.6 ± 4.1	61.5 (54.9-62.5)	

**p*=Wilcoxon–Mann–Whitney

Cuadro 11. Razón de momios e intervalos de confianza 95% de cáncer bucal y orofaríngeo

	RM* (95%IC)	<i>p</i>
Sexo		
Masculino	1.00	
Femenino	2.40 (0.49-11.67)	0.277
Tabaco		
No	1.00	
Si	0.19 (0.01-4.18)	0.302
Etapa clínica		
III/IV (avanzado)	1.00	
I/II (temprano)	19.11 (1.88-193.63)	0.013

*Ajustada sexo, tabaco y etapa clínica.

9. DISCUSIÓN

La presente investigación representa un estudio de casos y controles pareado por edad y sexo, este diseño es considerado una estrategia muestral, que nos permite evaluar un evento de interés con base en la presencia (caso) o ausencia (control) del mismo, y que representa una herramienta útil para estudiar problemas de salud poco frecuentes y de larga evolución, como lo es el CByO (Lazcano-Ponce y cols. 2001).

9.1 Características clínico patológicas de los casos

De forma similar a estudios de casos y controles previos (Canova y cols. 2010, Anaya-Saavedra y cols. 2008, Muwonge y cols. 2008, Vlajinac y cols. 2006), en este estudio el consumo de tabaco y alcohol representan un importante factor de riesgo asociado con la presencia de CByO.

En cáncer bucal la zona anatómica predominantemente afectada, de acuerdo a diversos estudios (Watanabe y cols. 2010, Anaya-Saavedra y cols. 2008, Brandizzi y cols. 2008), Ishida y cols. 2005) es la lengua, en cualquiera de las porciones en la que es clasificada, los hallazgos de este estudio confirman esta asociación, lengua fue afectada en el 61% de los casos de cáncer bucal incluidos.

Estudios previos realizados en la Ciudad de México reportaron que el diagnóstico del CByO se realiza de forma tardía, lo cual repercute en el pronóstico y en la calidad de vida de los pacientes (Anaya-Saavedra y cols. 2008, Frías y cols. 1997, Ramírez-Amador y cols. 1995). Respecto a este punto, diversos estudios (Zuo y cols. 2009, Anaya-Saavedra y cols. 2008, Brandizzi y cols. 2008, Sengupta y cols. 2007, Ibieta y cols. 2005) han reportado que una mayor frecuencia de los pacientes con CByO son diagnosticados en

etapas clínicas avanzadas de la enfermedad (etapas III y IV), en el presente estudio el 62% de los casos incluidos al momento del diagnóstico se encontraban en estados avanzados de la enfermedad, por lo cual el CByO sigue representando un problema importante de salud pública.

Por otro lado, con relación a los antecedentes familiares de cáncer, diversos estudios han demostrado que representan un importante factor de riesgo para el desarrollo de CByO, en este estudio se observó que los pacientes con historia familiar de cáncer mostraban un riesgo de 3.2 veces mayor de presentar cáncer en comparación con los controles (Anaya-Saavedra y cols. 2008, Garavello y cols. 2008, Brown y cols. 2001, Goldstein y cols. 1994).

9.2 Metilación del gen *hMLH1* y expresión de su proteína en cáncer bucal y orofaríngeo

En el presente se analizó el estado de metilación del gen *hMLH1* en casos de CByO de reciente diagnóstico atendidos en el INCan comparándose con un grupo control pareado por edad y sexo, y representa la primera investigación realizada en población mexicana que sugiere una fuerte tendencia de asociación entre la metilación del gen *hMLH1* y el cáncer bucal y orofaríngeo.

Diversos estudios han reportado una asociación entre la inactivación del gen *hMLH1* por metilación de su promotor y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, entre los cuales se encuentran los carcinomas de esófago y los de cavidad bucal, en el presente estudio la frecuencia de metilación del gen *hMLH1* en cáncer bucal fue del 74%, la cual es mayor a la reportada en algunos estudios sobre tumores de cabeza y cuello donde las

frecuencias van del 23% al 50% (Liu y cols. 2003, Sengupta y cols. 2007), de igual forma que en los casos de cáncer de esófago cuyas frecuencias de metilación se han observado del 3 % al 33% (Wang y cols. 2008, Guo y cols. 2006) y con respecto al cáncer bucal las frecuencias reportadas son menores y varían del 8% al 17% (Czerninski y cols. 2009, Viswanathan y cols. 2002). Por otro lado, existen estudios que han reportado frecuencias similares a lo reportado en este estudio; para carcinomas de esófago se reportó una frecuencia del 62% (Tzao y cols. 2005) y en tumores de cáncer de cabeza y cuello del 69% (Steinmann y cols. 2009). En contraste, Liu y cols. (2002) reportaron una frecuencia mayor de metilación en el gen *hMLHI* (92%) para tumores de cabeza y cuello. La diversidad entre las frecuencias reportadas para la metilación del gen *hMLHI* en las diversas neoplasias de cabeza y cuello pueden atribuirse a diferencias entre las poblaciones estudiadas, al número de muestras incluidas, al diseño de estudio, así como al método utilizado para el análisis de promotor del gen.

Un hallazgo importante en el presente estudio fue la asociación entre la metilación del gen *hMLHI* y el sexo femenino ($p=0.018$), la frecuencia mayor de metilación en mujeres con cáncer bucal también fue descrita por Czerninski y cols. (2009). Por otro lado, Hong y cols. (2005) reportaron de igual forma esta asociación entre la metilación y el sexo femenino en un estudio realizado en pacientes con cáncer gástrico. Este hallazgo se sugiere la evaluación de otras variables que pudieran estar involucradas en esta asociación, como los es el estilo de vida, dentro del cual se encuentra el estado nutricional, por otro lado, al ser un hallazgo relacionado con el sexo femenino, el factor hormonal pudiera de igual forma tener un papel importante en esta condición.

El estado nutricional es un punto clave en los procesos carcinogénicos, en especial la deficiencia de algunos nutrientes como el hierro y los folatos que se han relacionado con la presencia de eventos neoplásicos. La deficiencia de hierro se encuentra asociada principalmente con la anemia ferropénica, y existe evidencia de la asociación de este tipo de déficit alimenticio con algunos procesos carcinogénicos, como el cáncer gástrico y el cáncer bucal (Wolach y cols. 1998, Rennie y cols. 1984). Desde 1919 se ha reportado la asociación entre la deficiencia de hierro y la presencia de algunos tipos de cáncer, el síndrome de Plummer Vinson, también conocido como síndrome de Paterson-Kelly, es un síndrome caracterizado por presentar anemia ferropénica crónica, cambios atróficos en las membranas de la mucosa bucal, glosofaríngeas y esofágicas acompañadas con disfagia, así como la presencia de coiloniquia, en algunos casos estos síntomas se encuentran aunados a la presencia de algunos tipos de neoplasias, como el cáncer gástrico, el esofágico y el bucal (Kim y cols. 2005, Jessner y cols. 2003, Watts 1961). Desde que se describió por primera vez este síndrome se asoció con mayor frecuencia a las mujeres de mediana edad, y rara vez ha sido observado en los hombres.

Por otro lado, las deficiencias en folatos también se encuentran asociadas con ciertos desórdenes, el ácido fólico es crucial para la síntesis del ADN y puede regular la metilación del mismo, afectando principalmente los niveles de la coenzima S-adenosil metionina (SAM) que es principal donador de grupos metilo. La metilentetrahidrofolato reductasa y la metionina sintetasa son enzimas involucradas en el metabolismo del folato y pueden influir en la metilación del ADN (Scott 1999).

Se ha demostrado la participación de los niveles hormonales en los eventos epigenéticos, un estudio reciente (Papoutsis y cols. 2010) realizado con células de cáncer de

El estado nutricional es un punto clave en los procesos carcinogénicos, en especial la deficiencia de algunos nutrientes como el hierro y los folatos que se han relacionado con la presencia de eventos neoplásicos. La deficiencia de hierro se encuentra asociada principalmente con la anemia ferropénica, y existe evidencia de la asociación de este tipo de déficit alimenticio con algunos procesos carcinogénicos, como el cáncer gástrico y el cáncer bucal (Wolach y cols. 1998, Rennie y cols. 1984). Desde 1919 se ha reportado la asociación entre la deficiencia de hierro y la presencia de algunos tipos de cáncer, el síndrome de Plummer Vinson, también conocido como síndrome de Paterson-Kelly, es un síndrome caracterizado por presentar anemia ferropénica crónica, cambios atróficos en las membranas de la mucosa bucal, glossofaríngeas y esofágicas acompañadas con disfagia, así como la presencia de coiloniquia, en algunos casos estos síntomas se encuentran aunados a la presencia de algunos tipos de neoplasias, como el cáncer gástrico, el esofágico y el bucal (Kim y cols. 2005, Jessner y cols. 2003, Watts 1961). Desde que se describió por primera vez este síndrome se asoció con mayor frecuencia a las mujeres de mediana edad, y rara vez ha sido observado en los hombres.

Por otro lado, las deficiencias en folatos también se encuentran asociadas con ciertos desórdenes, el ácido fólico es crucial para la síntesis del ADN y puede regular la metilación del mismo, afectando principalmente los niveles de la coenzima S-adenosil metionina (SAM) que es principal donador de grupos metilo. La metilentetrahidrofolato reductasa y la metionina sintetasa son enzimas involucradas en el metabolismo del folato y pueden influir en la metilación del ADN (Scott 1999).

Se ha demostrado la participación de los niveles hormonales en los eventos epigenéticos, un estudio reciente (Papoutsis y cols. 2010) realizado con células de cáncer de

mama, reportó que existe un silenciamiento epigenético por metilación en el promotor del gen *BCRA1*, que es un gen reparador de daño al ADN, esta modificación epigenética se encuentra relacionada con cierta competencia entre el receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos y el receptor de estrógenos, la represión de este último receptor pudiera conducir ciertos mecanismos que favorezcan la metilación del gen *BCRA1*, no se han realizado estudios que evalúen si el gen *hMLH1* pudiera ser silenciado epigenéticamente por el receptor de estrógenos, y si este cambio favorece procesos carcinogénicos.

Existen controversias respecto a la asociación entre la metilación del gen *hMLH1* y el consumo de tabaco y alcohol, algunos estudios realizados en pacientes con cáncer de esófago y de cabeza y cuello han encontrado esta asociación (Wang y cols. 2008, Demokan y cols. 2006, Puri y cols. 2005). En contraste, Sengupta y cols. (2007) reportaron en un estudio realizado en tumores de cabeza y cuello que un porcentaje importante (64%) de los pacientes fumadores presentaban metilación del promotor del gen *hMLH1* en comparación con los pacientes que no tenían dicho hábito ($p=0.001$). En el presente estudio no se observó asociación entre metilación y el consumo de tabaco y alcohol.

La presencia de metilación en aquellos tumores menores a 4 cm (T1/T2) mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.023$), 24 (63%) de los tumores que mostraron metilación del gen *hMLH1* correspondían a una estadificación T1/T2, en contraste con 10 (77%) de los casos no metilados que correspondían a T3/T4. Opuesto a estos hallazgos, Wang y cols. (2009) no encontraron asociación entre el tamaño del tumor y la metilación del gen *hMLH1*.

Existe evidencia de que la metilación en el promotor del gen *hMLH1* se encuentra asociada con la disminución en la expresión de su proteína en carcinomas de esófago y de cabeza y cuello (Tzao y cols. 2005, Nunn y cols. 2003). Sin embargo, en el presente estudio no se observó dicha asociación, en 26 (68%) de los casos metilados se observó la expresión de la proteína hMLH1. Por su parte, Liu y cols. (2003) también observaron que no existía correlación entre la metilación del promotor de *hMLH1* y la expresión de su proteína. Por otro lado, Czerninski y cols. (2009) reportaron que dos de sus casos que presentaban metilación del promotor *hMLH1* resultaron moderadamente positivos para la expresión de su proteína.

La falta de asociación entre el estado de metilación y la expresión de la proteína puede ser atribuida al hecho de que la metilación puede provocar el silenciamiento de solo uno de los alelos y con este hecho no necesariamente se afectaría la expresión de la proteína, debido a que el otro alelo permanece no metilado y puede expresar su proteína, otra posibilidad de la falta de correlación entre la metilación y la expresión de proteína, puede ser un evento genético, ya que las mutaciones en el gen *hMLH1* repercuten en su adecuada expresión (Czerninski y cols. 2009). En cáncer de colon el gen *hMLH1* presenta altas tasas de mutaciones (Peel y cols. 2000, Aaltonen y cols. 1994), en CByO no existen estudios que hayan reportado la presencia de mutaciones para este gen.

Los casos de CB que presentaron metilación del promotor del gen *hMLH1* y que resultaron negativos a la expresión de la proteína correspondían a etapas tempranas de la enfermedad (I y II). Este hallazgo sugiere que la metilación es un evento temprano y que tal vez pueda mantenerse durante la progresión del tumor. Los resultados del análisis múltiple de regresión logística mostraron una RM de 19.11 (IC 1.88-193.63 $p=0.013$) para la

metilación del gen *hMLH1* y la ausencia de expresión de su proteína desde las etapas clínicas tempranas de la enfermedad (etapas I y II), controlando el análisis por sexo y tabaco, con estos hallazgos podemos sugerir que la metilación es un evento temprano en la carcinogénesis bucal.

Diversos trabajos (Wang y cols. 2009, Zuo y cols. 2009, Demokan y cols. 2006) realizados en tumores de esófago y cabeza y cuello no encontraron relación entre la metilación del promotor de *hMLH1* y la etapa clínica de los tumores incluidos. En contraste, Tzao y cols. (2005) reportaron que si existe asociación entre la metilación del gen *hMLH1* y la disminución en la expresión de su proteína con etapas tempranas de la enfermedad ($p=0.024$, $p<0.0001$, respectivamente), sugiriendo que la pérdida de expresión de la proteína hMLH1 por metilación de su promotor es un evento temprano en los tumores de esófago.

En este contexto, existen otros estudios realizados en carcinomas de cavidad bucal, esófago y cabeza y cuello en los que se evaluaron otros genes reparadores de ADN, como el gen *hMSH2* y el gen *MGMT* en los cuales la correlación entre el estado de metilación y la etapa clínica de los tumores no fue observada (Otha y cols. 2009, Zuo y cols. 2009, Demokan y cols. 2006).

En este estudio el estado de metilación del gen *hMLH1* fue analizado mediante la técnica de MSP, que es un método simple y específico para determinar el estado de metilación de las regiones genómicas ricas en dinucleótidos CpG localizadas en el promotor del gen. Este método es más sensible que el Southern blot, mediante el MSP se facilita la detección de un pequeño número de alelos metilados, para su estudio es

suficiente con una pequeña muestra de ADN (Herman y cols. 1996), este método es considerado básicamente una prueba cualitativa, mas que cuantitativa (Xiong y Laird 1997). Para obtener un análisis más preciso del estado de metilación de las islas CpGs y definir su ubicación el método que se debe seleccionar es la secuenciación genómica (Herman y cols. 1996).

En un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de colon (Deng y cols. 1999) se utilizó el método de secuenciación para analizar el estado de metilación de los sitios CpG ubicados en el promotor del gen *hMLHI*, lo cual permitió identificar los sitios claves en el promotor que inhiben la expresión de su proteína, lo cual es un hallazgo importante que permite de forma parcial explicar la falta de correlación entre el estado de metilación y la expresión de la proteína reportada por estudios previos (Liu y cols. 2003, Czerninski y cols. 2009), en los cuales al utilizar el método de MSP únicamente se indica si se encuentra metilación del gen *hMLHI* o no, con lo cual no es posible determinar cuales son los sitios en el promotor que se encontraban metilados, y si estos sitios ejercían un papel represor en la expresión de la proteína.

El análisis de la expresión de la proteína hMLHI fue realizado mediante la técnica de inmunohistoquímica, que es considerado un método económico para determinar la presencia de la proteína. Diversos estudios han comprobado que esta técnica proporciona cerca del 100% de especificidad y sensibilidad (Shia y cols. 2004, Marcus y cols. 1999).

Es importante destacar que se analizó un importante número de muestras control, las 204 muestras incluidas no mostraron metilación en el promotor del gen *hMLHI*. En algunos estudios previos (Czerninski y cols. 2009, Wang y cols. 2008, Tzao y cols. 2005)

se incluyeron muestras de tejidos normales para analizar el estado de metilación del gen *hMLH1* y de forma similar con los resultados del presente estudio fueron reportados como no metilados. El estado de no metilación en todas las muestras control incluidas sugieren que la metilación del gen *hMLH1* pudiera representar una posible marca específica de malignidad.

A pesar de la alta frecuencia de metilación en las muestras estudiadas, un importante porcentaje de estas muestras presento expresión de la proteína hMLH1 (76%), lo cual podría sugerir que la expresión de la proteína tiene una participación relevante en estos procesos carcinogénicos, y puede no estar ligada al estado de metilación en el promotor de gen, lo cual sugiere que la expresión de la proteína hMLH1 podría ser utilizada también como un biomarcador complementario con el estado de metilación del gen en los tumores de cavidad bucal y orofaríngea.

La analogía que en algunos aspectos presenta la mucosa de cérvix con la mucosa bucal ha permitido que hallazgos importantes en la conducta de este tipo de neoplasias, puedan ser un indicador de lo que puede estar ocurriendo en el CByO. En relación a este contexto, estudios previos realizados en cáncer de cérvix (Ciavattini y cols. 2005, Kwaśniewska y cols. 2002), también evaluaron la participación del gen *hMLH1* en las neoplasias cervicales, por su importante desempeño en el sistema MMR, y han reportado que existe una fuerte asociación entre la presencia de la expresión de la proteína hMLH1 y los carcinomas invasivos de cérvix. Ciavattini y cols. (2005) analizaron mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína hMLH1 en lesiones NIC (neoplasia intraepitelial cervical) y carcinomas de cérvix, comparándolos con muestras de cérvix normal, los hallazgos muestran diferencias estadísticamente significativas entre la

expresión de la proteína hMLH1 en las NIC y los carcinomas, en comparación con las muestras de tejido normal ($p < 0.0001$, $p = 0.0009$, respectivamente), lo cual sugiere que esta asociación puede observarse desde las etapas tempranas de la carcinogénesis de cérvix. Por su parte, Kekeeva y cols. (2006) reportaron una frecuencia de metilación del gen *hMLH1* en 51% de las muestras de NIC III estudiadas, lo cual sugiere que de igual forma que en CByO en cáncer de cérvix la metilación del gen *hMLH1* es un evento epigenético temprano.

Finalmente, otro aspecto importante de resaltar en este estudio, es el porcentaje de metilación del gen hMLH1 observado en aquellos casos que no presentaban los antecedentes de tabaco, alcohol ni infección por VPH, que fue del % y que deja sobre la mesa mas incógnitas sobre la carcinogénesis del CByO, con los resultados de este trabajo queda el antecedente de que la metilación del gen hMLH1 y la expresión de la proteína juegan un papel importante en el desarrollo de este tipo de neoplasias y que pueden ser independientes de los efectos ocasionados por el consumo de tabaco, alcohol y la infección por VPH, sin embargo, es necesario realizar mas estudios que permitan consolidar estos hallazgos y que analicen otros mecanismos que aún no se han identificado.

9.3 Infección por VPH y cáncer bucal y orofaríngeo

Estudios previos (Anaya-Saavedra y cols. 2008, Ha y Califano 2004) han demostrado que existe una asociación entre la presencia de VPH y el cáncer bucal y orofaríngeo, especialmente con los VPH de alto riesgo (VPH-AR), reportándose RM de 5.8 y 6.2 respectivamente.

La asociación del VPH y cáncer bucal y orofaríngeo se incrementa principalmente cuando se involucran zonas anatómicas específicas, como son la base de lengua y las

amígdalas (Hansson y cols. 2005, Kreimer y cols. 2005, Syrjänen y cols. 2005). En este mismo sentido, Hanson y cols. (2005) reportaron una razón de momios mayor para los carcinomas de orofarínge con VPH-AR (RM 230 IC 95% 45-1200), adicionalmente, en otro estudio se observó que el riesgo de cáncer orofaríngeo en pacientes con VPH-AR fue de 12.3 (D´Souza y cols. 2007).

En la presente investigación la prevalencia de VPH-AR en los casos fue del 2% y en los controles del 0.5%, en ambos grupos las muestras resultaron positivas para VPH-16. Si bien la frecuencia reportada en este estudio es baja, coincide con estudios previos que reportaron frecuencias del 4% (Machado y cols. 2009, Herrero y cols. 2003). En este estudio predominantemente los casos incluidos correspondieron a cavidad bucal (98%) y fueron VPH negativos, el caso que fue positivo para VPH se localizaba en la mucosa de orofarínge, y correspondía a una lesión ubicada en la amígdala, y adicionalmente resultó ser positivo a VPH-AR (VPH-16).

Se ha reportado que existe una mayor asociación de VPH en los carcinomas de orofarínge, las frecuencias para este tipo de neoplasia van del 36 al 73% (Machado y cols. 2010, Kreimer y cols. 2005), en comparación con los carcinomas de la cavidad bucal donde las frecuencias reportadas son menores y van del 4 al 43% (Machado y cols. 2010, Anaya-Saavedra y cols. 2008).

En el presente estudio se utilizó la técnica de PCR para determinar la presencia de VPH en las muestras incluidas, es una prueba con alta sensibilidad que ha sido confirmada por diferentes estudios, analizando de igual forma muestras de cérvix y de cavidad bucal (Agoston y cols. 2010, Ha y Califano 2004, Remmerbach y cols. 2004, Venuti y cols.

2004, Guerrero y cols. 1992). Adicionalmente, para garantizar la efectividad en la determinación de la presencia del VPH se incrementó la capacidad de detección con el uso de cuatro juegos de oligonucleótidos específicos para la detección del VPH (MY09/MY11, GP5+/GP6+, PGMY y E6 del VPH-16) que ya han sido reportados por otros estudios (Coutlée y cols. 2002, de Roda y cols. 1995, Manos y cols. 1989).

En un meta-análisis (Kreimer y cols. 2005) que incorporó 60 estudios realizados en 25 países que incluían mas de 5000 muestras de carcinomas de cabeza y cuello, se determinó la presencia de VPH en el 26% de las muestras de cáncer de cabeza y cuello y en el 36% de las muestras de orofaringe mediante el uso del método de PCR. Por otro lado, un estudio reciente ¹⁵⁶ evaluó la efectividad del método de PCR en comparación con la hibridación in situ, donde se observó una sensibilidad del 90% para la técnica de PCR, confirmando que esta técnica es adecuada y económica para evaluar el estado del VPH en los carcinomas orofaríngeos, comparable con la sensibilidad de la hibridación in situ.

La afinidad del VPH por el tejido amigdalino, que histológicamente corresponde a un epitelio no queratinizado, ha sido confirmada por diversos estudios (Ang y cols. 2010, Gillespie y cols. 2009), donde se han reportado prevalencias mayores para los carcinomas de orofaringe VPH positivos en comparación con los carcinomas localizados en otras zonas anatómicas de la cavidad oral. El epitelio de la amígdala y la base de lengua se caracterizan por presentar invaginaciones que exponen a las células epiteliales basales, que son el blanco específico de la infección por VPH (Gillespie y cols. 2009).

Diversas características se han establecido para diferenciar los CCyC VPH positivos de los negativos, entre las cuales se encuentran factores moleculares, epidemiológicos y

clínicos con lo que se refuerza la teoría de que son entidades distintas y que las causas asociadas con su desarrollo son diferentes (Guerrero-Preston y cols. 2009, Gillespie y cols. 2009, Gillison y cols. 2008).

Las características clínico patológicas de la mayoría de los casos incluidos en este estudio y que resultaron VPH negativos concuerdan con las características que han sido descritas para los pacientes con cáncer bucal VPH negativos, principalmente la correspondiente a la localización anatómica de la lesión, en este estudio el 98% de los tumores fueron localizadas en cavidad bucal, en lo que respecta a los factores epidemiológicos, los casos corresponde a pacientes fumadores y bebedores, adicionalmente el 82% de estos pacientes fueron mayores de 50 años. Por otro lado, solo un caso resultó positivo a VPH-AR con características clínico-demográficas coincidentes con las reportadas para los carcinomas de orofaringe VPH positivos, entre las que destacan: < 50 años de edad, sin antecedentes de tabaco y alcohol, con afección de la zona amigdalina, aunado a la presencia de nódulo linfático y con la presencia de metástasis.

La baja prevalencia de VPH observada en el presente estudio pudiera atribuirse a varios factores; diversos estudios han analizado cuales pueden ser las posibles causas de la variabilidad entre las frecuencias reportadas para la infección por VPH en el CByO, entre las cuales destacan las siguientes: con respecto a la muestra de ADN, el método de extracción y purificación, así como su conservación de la muestra representa en punto muy importante a considerar, debido a que se ha demostrado que varía entre los diferentes estudios (Dahlgren y cols. 2004, Roman y Fife 1989), el aspecto étnico y geográfico de la población de estudio (Li y cols. 2007, 2004, 2003, Kreimer y cols. 2005, Herrero y cols. 2003), el número de muestras analizadas (Kreimer y cols. 2005), el sitio anatómico de la

muestra (Kreimer y cols. 2005, Herrero y cols. 2003, Li y cols. 2003), el método de detección utilizado (Campisi y cols. 2007, Ha y Califano 2004, Remmerbach y cols. 2004, Miller y cols. 2001, Smith y cols. 2000) y un punto que puede causar controversia, que es el referente a la posibilidad de contaminación de las muestras (Ha y Califano 2004, Roman y Fife 1989).

Cabe mencionar, que en el presente estudio se trató de controlar al máximo aquellas variables que por condiciones técnicas pudieran repercutir en los resultados, como lo fue la toma de muestras, en la cual se aseguró que la toma fuera realizada únicamente del sitio afectado sin involucrar zonas anatómicas diferentes, por otro lado, el análisis de las muestras fue realizado en un laboratorio que no manejaba muestras de VPH, con lo que se aseguró que no existiera contaminación por VPH en las muestras analizadas. A este respecto se ha demostrado que incluso en las líneas celulares puede existir contaminación por VPH, ejemplo de ello son las líneas celulares Hep 2, proveniente de cáncer de laringe, y la línea celular KB, que corresponde a cáncer de lengua, en las que se ha demostrado la presencia de VPH-18, probablemente asociado a contaminación en estas líneas celulares con el VPH (Ogura y cols. 1993).

En relación a los hallazgos descritos por estudios previos (Anaya Saavedra y cols. 2008, Ibieta y cols. 2005) realizados en el INCan, en los cuales las prevalencias de VPH asociados con el cáncer bucal fueron de 43 y 42%, respectivamente, cabe mencionar que en el estudio de Ibieta y cols. (2005) la determinación de la presencia de VPH fue realizada en muestras tisulares de cáncer bucal, a diferencia del estudio de Anaya Saavedra y cols. (2008) donde la determinación del VPH fue realizada en cepillados citológicos, de la

misma forma que fue realizada en la presente investigación. Si bien las técnicas de recolección de las muestras fueron similares en el presente estudio y en el descrito por Anaya Saavedra y cols. (2008), algunas variaciones que pudieran haber influido en la diferencia de los resultados reportados son las siguientes: la fuerza aplicada en la toma del cepillado citológico, así como el número de veces que fue girado el cepillo sobre la mucosa bucal para la obtención de muestras, otro aspecto a considerar es el manejo, almacenamiento y preservación de las muestras, donde la temperatura juega un papel importante en su preservación. Finalmente, otro punto importante es que el procesamiento de las muestras fue realizado en laboratorios diferentes.

Es importante destacar la historia natural de la infección por VPH, estudios previos (Smith y cols. 2007, Ferreccio y cols. 2004) han demostrado que a lo largo de la vida la infección por VPH presenta una curva bimodal, con un pico en las primeras décadas de la vida, un decremento posterior a la infección inicial, un nuevo incremento entre la tercera y quinta década de la vida, probablemente por la posible reactivación o reinfección con el VPH, y finalmente un decremento en las últimas décadas de la vida.

El incluir en el presente estudio el análisis de la variable de infección por VPH, fue considerado tomando en cuenta dos importantes condiciones biológicas en las que se ve involucrado el VPH en el CByO, la primera: por su importante papel como factor de riesgo relacionado con la presencia de este tipo de neoplasias, y la segunda: por el efecto modulador que ejercen las oncoproteínas E6 y E7 del VPH sobre las ADN metiltransferasas, lo cual ha sido relacionado con la presencia de metilación de algunos genes en procesos neoplásicos (Laurson y cols. 2010, Burgers y cols. 2007, Lin y cols.

2005). Esta asociación se ha demostrado en casos de cáncer de pulmón, en los que se observó que el gen p16 presentaba metilación por el efecto de E6 y E7 (Lin y cols. 2005). En la presente investigación, debido a la baja prevalencia de infección por VPH no fue posible determinar si existía alguna asociación entre la infección del VPH y el estado de metilación del gen *hMLH1* en los casos de CByO incluidos en este estudio.

9.4 Limitaciones del estudio

Las limitaciones del presente estudio pueden atribuirse a dos posibles condiciones: la primera corresponde a las que el mismo diseño de casos y controles predispone (Lazcano-Ponce y cols. 2001), se pueden generar frecuentemente sesgos de información, debido a que la exposición a factores de riesgo, en la mayoría de los casos, se mide, reconstruye o cuantifica, después del desarrollo de la enfermedad, por otro lado, el sesgo de recuerdo o confusión puede relacionarse con las variables relacionadas con la enfermedad, como ocurre con los antecedentes familiares.

Otra limitante del diseño, es la falta de seguimiento en los pacientes, con el cual se podría evaluar si los cambios epigenéticos en las etapas clínicas tempranas de la enfermedad persisten o se adquieren en las etapas avanzadas. La segunda condición esta relacionada con los aspectos que surgen a lo largo del estudio y que son observados en los resultados. Con el estudio histológico de las muestras incluidas se trató de asegurar que más del 90% de la muestra correspondiera a células tumores, lo cual tendría más certeza si se hubiese utilizado microdissección en las muestras, con lo que se garantizaría el 100% de la muestra corresponde a células tumorales.

El análisis de secuenciación en las muestras permitiría determinar la localización de las islas CpGs metiladas en el promotor del gen *hMLH1*, con lo que se sustentaría la razón por la cual se observó expresión de la proteína en algunos casos metilados. No se obtuvo información sobre factores nutricionales en la muestra estudiada, el antecedente de mayor metilación en mujeres, no puede sustentarse de forma contundente, debido a que no se analizaron variables que pudieran estar asociadas con esta condición, como lo es el aspecto nutricional.

El tamaño de muestra, representó otra limitante del presente estudio, el CByO es una condición poco frecuente, la inclusión de pacientes puede verse limitada por diversas cuestiones, como lo es la etapa clínica en la que el paciente se presenta a este centro de referencia, en condiciones avanzadas de la enfermedad la obtención de muestras es prácticamente imposible, por otro lado, la obtención de muestras adecuadas, incluyendo viabilidad, tamaño y criterios histológicos, también representó una limitante del presente estudio, por otro lado, el factor tiempo también es importante, el periodo de inclusión fue corto y sólo se logró la inclusión de 51 casos de CByO, con los que no fue posible observar algunas asociaciones que con una muestra mas grande probablemente pudieran demostrarse. Por otro lado, con respecto a los resultados observados en este estudio, al trabajar con una muestra relativamente pequeña (51 casos) se presenta otra limitante, intervalos de confianza son muy grandes, que si bien a pesar de ser una muestra pequeña se alcanzó la significancia estadística, el rango entre los intervalos de confianza es muy amplio, lo cual puede debilitar los resultados.

Finalmente, el alto porcentaje de metilación observado en los casos de CByO en este estudio, pudiera estar asociado con inestabilidad genómica, por lo tanto, el analizar si existe esta alteración genómica permitiría determinar si este tipo de inestabilidad es la causa del alto porcentaje de metilación reportado en este estudio.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten aportar las siguientes conclusiones:

- La asociación entre la metilación en el promotor del gen *hMLHI* y la ausencia de expresión de su proteína con el cáncer bucal, es un evento epigenético que juega un papel importante desde las etapas tempranas de la carcinogénesis bucal.
- La metilación del gen *hMLHI* y la falta de expresión de su proteína, independientemente del consumo de tabaco y alcohol, representan un mecanismo altamente asociado con el desarrollo del CByO.
- La presencia de la metilación en el gen *hMLHI* desde las etapas tempranas de la enfermedad, sugiere la posible aplicación de terapia epigenética en este tipo de tumores.
- La metilación del gen *hMLHI* se encuentra altamente asociada con el sexo femenino.
- La baja prevalencia de VPH asociado con el CByO en la presente investigación, no permite determinar la presencia de algún tipo de asociación con las variables analizadas en este estudio.

- Los factores de riesgo tabaco y alcohol se encuentran fuertemente asociados con la presencia del CByO, hallazgo que sigue siendo consistente con lo reportado en la literatura.
- Los antecedentes familiares de cáncer en primera línea representan un importante factor de riesgo asociado con la presencia de CByO.

11. PERSPECTIVAS

Con los resultados descritos surgen nuevas incógnitas, y a continuación se enumeran algunos puntos que sería conveniente tomar en cuenta para la realización de futuros estudios.

- Incluir en estudios posteriores la determinación de los factores nutricionales, para poder evaluar el impacto que puedan tener sobre los eventos epigenéticos, en especial sobre la metilación de genes en los casos de CByO.
- Incluir el análisis de muestras con desórdenes potencialmente malignos que permitan confirmar que los eventos epigenéticos pueden ser utilizados como indicadores de diagnóstico temprano, lo cual repercutiría en el tratamiento oportuno del CByO.
- Realizar estudios de seguimiento que permitan evaluar si la presencia de la metilación de genes, como evento epigenético observado desde las etapas tempranas de la enfermedad, es sostenido hasta las etapas tardías de la enfermedad.

- Analizar un número importante de muestras de CByO con infección por VPH que permitan definir si existe una asociación entre la presencia del virus y el estado de metilación.
- Tomando en cuenta que no se ha reportado la presencia de mutaciones del gen *hMLHI* en CByO, realizar el análisis del gen en la búsqueda de posibles mutaciones que pudieran estar asociadas con el desarrollo del CByO.
- Analizar si la asociación entre la metilación del gen *hMLHI* y el sexo femenino, descrito en este estudio, tiene implícita la participación hormonal o simplemente pudiera estar relacionada con los factores nutricionales, con lo cual se dilucidaría si es un hallazgo relacionado a género o si únicamente fue una tendencia en este estudio.

12. POSIBLES APLICACIONES

Los resultados del presente estudio permiten sugerir probables aplicaciones de los hallazgos descritos. La presencia de metilación en el gen *hMLHI* en las etapas clínicas I y II del CByO, pudiera ser utilizada como un marcador de diagnóstico clínico temprano, por otro lado, el uso de la terapia epigenética en los casos de CByO que presenten metilación del gen *hMLHI* podría coadyuvar con los esquemas de tratamiento convencional en el CByO, favoreciendo la respuesta a dicho tratamiento, y que probablemente pudiera influir en el control total de la enfermedad, considerándose de esta forma que la metilación del gen *hMLHI* podría ser utilizada como probable factor pronóstico del CByO.

13. REFERENCIAS

- Aaltonen LA, Peltomäki P (1994). Genes involved in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **14**, 1657-1660.
- Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996). hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13629-13634.
- Agoston ES, Robinson SJ, Mehra KK, Birch C, Semmel D, Mirkovic J, Haddad RI, Posner MR, Kindelberger D, Krane JF, Brodsky J, Crum CP (2010). Polymerase chain reaction detection of HPV in squamous carcinoma of the oropharynx. *Am J Clin Pathol* **134**, 36-41.
- American Joint Committee on Cancer (1997). *AJCC Cancer staging manual*, (Lippincott Williams and Wilkins). 5th Edition. Chicago.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, García-Carrancá A (2008). High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study in Mexico City. *Arch Med Res* **39**, 189-197.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Zimbrón-Romero A, Zepeda-Zepeda MA (2008). Oral and pharyngeal cancer mortality rates in Mexico, 1979-2003. *J Oral Pathol Med* **37**, 11-17.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **363**, 24-35.
- Balderas-Loaeza A, Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador VA, Guido-Jimenez MC, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Bernard HU, Garcia-Carranca A (2007). Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **120**, 2165-2169.

- Ban C, Yang W (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**, 541-552.
- Bernard HU (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* **1**, S1-6.
- Bettcher DW, Sanda LS (2008). Clinical cancer control and prevention. Eliminating tobacco-induced cancers: a worldwide challenge. *Ann Oncol* **7**, 230-233.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, Farfan-Morales JE, Irigoyen-Camacho ME, Damián-Matsumura P (2008). Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol* **44**, 805-11.
- Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE (2008). Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* **13**, E544-548.
- Brennan P, Boffetta P (2003). Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of head and neck cancer. In: Bird M, Boffetta P, Buffler P, Rice J, editors. Mechanistic insights in the molecular epidemiology of cancer. IARC scientific publications no. 157. Lyons (France): IARC Press.
- Broaddus RR, Lynch HT, Chen LM, Daniels MS, Conrad P, Munsell MF, White KG, Luthra R, Lu KH (2006). Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cancer* **106**, 87-94.
- Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, Fraumeni JF, Jr, Hayes RB (2001). Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. *Cancer* **92**, 2102-2108.
- Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* **33**, 533-564.

Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* **26**, 1650-1655.

Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordeiro JA, Rahal P (2007). Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **173**, 31-37.

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.

Canova C, Richiardi L, Merletti F, Pentenero M, Gervasio C, Tanturri G, Garzino-Demo P, Pecorari G, Talamini R, Barzan L, Sulfaro S, Franchini G, Muzzolini C, Bordin S, Pugliese GN, Macrì E, Simonato L (2010). Alcohol, tobacco and genetic susceptibility in relation to cancers of the upper aerodigestive tract in northern Italy. *Tumori* **96**, 1-10.

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. Bettcher (2004). The role of type tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* **108**, 741-749.

Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Karja J, Syrjänen K (1990). Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* **282**, 493-497.

Chang KW, Chang CS, Lai KS, Chou MJ, Choo KB (1989). High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan. *J Med Virol* **28**, 57-61.

Ciavattini A, Piccioni M, Tranquilli AL, Filosa A, Pieramici T, Goteri G (2005). Immunohistochemical expression of DNA mismatch repair (MMR) system proteins (hMLH1, hMSH2) in cervical preinvasive and invasive lesions. *Pathol Res Pract* **201**, 21-25.

Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E (2002). Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* **40**, 902-907.

Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D (2009). Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* **15**, 206-213.

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hogmo A, Bjornestal L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E (2004). Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* **112**, 1015-1019.

Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS (1999). Methylation of CpG in small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* **59**, 2029-2033.

de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H (1985). Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* **36**, 575-578.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJ (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76**, 1057-1062.

De Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, Nuyts S (2009). Promotor methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol Rep* **21**, 507-513.

D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML (2009). Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* **199**, 1263-1269.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry AR, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **19**, 1944-1956.

Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, Peters JH, DeMeester TR, Danenberg KD, Danenberg PV, Laird PW, Skinner KA (2000). Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* **60**, 5021-5026.

Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148-1159.

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **100**, 261-269.

Feinberg AP, Tycko B (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-153.

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ (2000). Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* **60**, 4864-4868.

Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ, Vaccarella SV, Jara AT, Puschel KI, Robles SC, Herrero R, Franceschi SF, Ojeda JM (2004). Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 2271-2276.

Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Kim HK, Christen RD, Howell SB (1997). Expression of the DNA mismatch repair proteins hMLH1 and hPMS2 in normal human tissues. *British Journal of Cancer* **76**, 890-893.

Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C (1999). Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* **35**, 375-378.

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ (2000). Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* **60**, 4864–8.

Frías M, Zeichner I, Suchil L, Ochoa F (1997). Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev Inst Nal Cancerol Mex* **43**, 80-85.

Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sorensen JA (2005). Cytoplasmic expression of E-cadherin and B-catenin correlated with LOH and hypermethylation of APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **34**, 116-119.

Garavello W, Foschi R, Talamini R, La Vecchia C, Rossi M, Dal Maso L, Tavani A, Levi F, Barzan L, Ramazzotti V, Franceschi S, Negri E (2008). Family history and the risk oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* **15**, 1827-1831.

Garcia-Carranca A, Gariglio PV (1993). [Molecular aspects of human papillomaviruses and their relation to uterine cervix cancer]. *Rev Invest Clin* **45**, 85-92.

Gillison ML, 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.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **9**, 709-720.

Gillison ML, Koch WM, Shah KV (1999). Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* **11**, 191-199.

Gillespie MB, 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.

Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, Moon CS (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* **131**, 986-993.

Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, Winn DM, Bernstein L, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Jr (1994). Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **30**, 319-322.

Gu L, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM (1998). ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* **26**, 1173-1178.

Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Zubiri ML, Ascunce N (1992). Comparison of Virapap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol* **30**, 2951-2959.

Guerrero-Preston R, Baez A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M (2009). Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *P R Health Sci J* **28**, 24-29.

Guerrette S, Acharya S, Fishel R (1999). The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* **274**, 6336-6341.

Guo M, Ren J, House MG, Qi Y, Brock MV, Herman J (2006). Accumulation of promoter methylation suggests epigenetic progression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* **12**, 4515-4522.

Gutman LT, Herman ME, Phelps WC (1999). Transmission of human genital papillomavirus disease: comparison of data from adults and children. *Pediatrics* **91**, 31-38.

Ha PK, Califano JA (2004). The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 188-196.

Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996). Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3. *Curr Biol* **6**, 1185-1187.

Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E (2006). Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* **119**, 2620-2623.

Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt E, Bladström A, Andersson G (2005). Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* **125**, 1337-1344.

Hazard K, Andersson K, Dillner J, Forslund O (2007). Human papillomavirus subtypes are not uncommon. *Virology* **362**, 6-9.

Hashibe M, McKay JD, Curado MP, Oliveira JC, Koifman S, Koifman R, Zaridze D, Shangina O, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Levi JE, Matos E, Laggiou P, Laggiou A, Benhamou S, Bouchardy C, Szeszenia-Dabrowska N, Menezes A, Dall'Agnol MM, Merletti F, Richiardi L, Fernandez L, Lence J, Talamini R, Barzan L, Mates D, Mates IN, Kjaerheim K, Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Simonato L, Canova C, Holcátová I, Agudo A, Castellsagué X, Lowry R, Janout V, Kollarova H, Conway DI, McKinney PA, Znaor A, Fabianova E, Bencko V, Lissowska J, Chabrier A, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Brennan P (2008). Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. *Nat Genet* **40**, 707-709.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM,

smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* **99**, 777-789.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabiánová E, Bencko V, Moullan N, Chabrier A, Hung R, Hall J, Canzian F, Brennan P (2006). Evidence for an important role of alcohol-and-aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 696-703.

Hecht SS (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1194-1210.

Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349**, 2042-2054.

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 MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, 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.

Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ (2006). Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* **31**, 259-266.

Holliday R (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**, 163-170.

Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, Kwon JG, Sohn YK, Kwak EK, Kim JW (2005). DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* **20**, 236-241.

IARC Monographs (1999). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 17–24 February 1998. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum; 71 Pt 1:1–315.

IARC (1995). Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. **64**, 1-378.

Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruiz-Godoy L, Mohar A (2005). Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **99**, 311-315.

Idris AM, Ibrahim SO, Vasstrand EN, Johannessen AC, Lillehaug JR, Magnusson B, Wallström M, Hirsch JM, Nilsen R (1998). The Swedish snus and the Sudanese toombak: are they different? *Oral Oncol* **34**, 558-566.

Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, Konishi N (2005). Promoter hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **41**, 614-622.

Jessner W, Vogelsang H, Püspök A, Ferenci P, Gangl A, Novacek G, Bodisch A, Wenzl E (2003). Plummer-Vinson syndrome associated with celiac disease and complicated by postcricoid carcinoma and carcinoma of the tongue. *Am J Gastroenterol* **98**, 1208-1209.

Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, Adler-Storthz K, Dahlstrom KR, Schiller JT, Wei Q, Li G (2008). p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. *Carcinogenesis* **29**, 875-879.

Jiricny J, Nyström-Lathi M (2000). Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 157-161.

Jiricny J (1998). Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res* **409**, 107-121.

Jiricny J (1998). Replication errors: cha(lle)nging the genome. *Embo J* **17**, 6427-6436.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities balanced rearrangements vs. genomic imbalance? *Genes Chromosomes Cancer* **16**, 155-163.

Kargul J, Laurent GJ (2009). Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1.

Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R (2009). Clinical significance of epigenetic inactivation of hMLH1 and BRCA1 in Tunisian patients with invasive breast carcinoma. *J Biomed Biotechnol* **2009**, 369129.

Kass SU, Pruss D, Wolffe AP (1997). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* **13**, 444-449.

Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T (2006). Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinoma and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 735-743.

Kekeeva TV, Zhevlova AI, Podisov IuI, Solov'eva IuV, Zaletataev DV, Nemtsova MV (2006). Aberrant methylation of tumor suppressor genes and allelic imbalance in cervical intraepithelial neoplasia. *Mol Biol (Mosk)* **40**, 224-230.

Kim HG, Lee S, Kim DY, Ryu SY, Joo JK, Kim JC, Lee KH, Lee JH (2010). Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients. *J Surg Oncol* **101**, 28-35.

Kim KH, Kim MC, Jung GJ (2005). Gastric cancer occurring in a patient with Plummer-Vinson syndrome: a case report. *World J Gastroenterol* **11**, 7048-7050.

Kingler H, Hemmerle C, Bannwart F, Haider R, Cattaruzza MS, Marra G (2002). Expression of the hMLH6 mismatch repair protein in colon cancer and HeLa cells. *Swiss Med Wkly* **132**, 57-63.

Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**, 2875-2884.

Kreimer AR, Clifford GM, 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.

Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JM, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bauer JA, Bradford CR, Carey TE (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.

Kwaśniewska A, Goździcka-Józefiak A, Postawski K, Miturski R (2002). Evaluation of DNA mismatch repair system in cervical dysplasias and invasive carcinomas related to HPV infection. *Eur J Gynaecol Oncol* **23**, 231-235.

Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K, Raj K (2010). Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* **31**, 918-926.

Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Hernández-Ávila M (2001). Case-control studies: theoretical bases, variants and applications. *Salud Pub Mex* **43**, 135-510.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-627.

Li B, Liu W, Wang L, Li M, Wang J, Huang L, Huang P, Yuan Y (2010). CpG island methylator phenotype associated with tumor recurrence in tumor-node-metastasis stage I hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 1917-26.

Li W, Tran N, Lee SC, O'Brien CJ, Tse GM, Scolyer RA, Hong A, Milross C, Yu KH, Rose BR (2007). New evidence for geographic variation in the role of human papillomavirus in tonsillar carcinogenesis. *Pathology (Phila)* **39**, 217-222.

Li W, Thompson CH, Cossart YE (2004). The site of infection and ethnicity of the patient influence the biological pathways to HPV-induced mucosal cancer. *Mod Pathol* **17**, 1031–1037.

Li W, Thompson CH, Xin D (2003). Absence of human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Chinese patients. *Am J Pathol* **163**, 2185-2189.

Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW (2005). An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett* **226**, 77-84.

Lin YL, Shivji MK, Chen C, Kolodner R, Wood RD, Dutta A (1998). The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **273**, 1453-1461.

Little MP. (2010). Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct* **5**, 19.

Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS (2000). MLH3: A DNA mismatch repair gene associated with mammalian instability. *Nature Genet* **36**, 801-818.

Liu K, Zuo C, Luo QK, Suen JY, Hanna E, Fan CY (2003). Promoter hypermethylation and inactivation of hMLH1, a DNA mismatch repair gene, in head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol* **12**, 50-56.

Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY (2002). Promoter hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Sug* **126**, 548-553.

Lodovici M, Bigagli E (2009). Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 874-888.

Machado J, Reis PP, Zhang T, Simpson C, Xu W, Perez-Ordoñez B, Goldstein DP, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S (2010). Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head Neck Oncol* **12**, 2-6.

Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, Merletti F, Boyle P (1995). Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **31**, 181-187.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989). Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* **7**, 209-214.

Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, Temple LK, Hsieh E, Hiruki T, Narod S, Bapat BV, Gallinger S, Redston M (1999). Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* **2**, 1248-1255.

Marra G, Schar P (1999). Recognition of DNA alterations by mismatch repair system. *Biochem J* **338**, 1-13.

McCullough MJ, Farah CS (2008). The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J* **53**, 302-305.

Miller CS, Johnstone BM (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.

Miller CS, White DK (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.

- Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H (2002) Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE. *Am J Epidemiol* **156**, 885-902.
- Modrich P (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 24727-24730.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn YL (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* **32**, S43-51.
- Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J (2001). Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **344**, 1125-1131.
- Mundo-Ayala JN, Jaloma-Cruz AR (2008). Assessing the inactivation pattern in chromosome X among symptomatic carriers and women with haemophilia. *Gac Med Mex* **144**, 171-174.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**, 518-527.
- Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, Sankaranarayanan R (2008). Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol* **44**, 446-454.
- Nakao M (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* **278**, 25-31.
- Nunn J, Nagini S, Risk JM, Prime W, Maloney P, Liloglou T, Jones AS, Rogers SR, Gosney JR, Woolgar J, Field JK (2003). Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* **39**, 115-129.

Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T (2002). Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **8**, 3164-3171.

Ogura H, Yoshinouchi M, Kudo T, Imura M, Fujiwara T, Yabe Y (1993). Human papillomavirus type 18 DNA in so-called HEP-2, KB and FL cells--further evidence that these cells are HeLa cell derivatives. *Cell Mol Biol* **39**, 463-467.

Papoutsis AJ, Lamore SD, Wondrak GT, Selmin OI, Romagnolo DF (2010). Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *J Nutr* **140**, 1607-1614.

Peel DJ, Ziogas A, Fox EA, Gildea M, Laham B, Clements E, Kolodner RD, Anton-Culver H (2000). Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1517-1522.

Peltomaki P, Vasen HF (1997). Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **113**, 1146-1158.

Peters ES, McCleanMD, LiuM, Eisen EA, Mueller N, Kelsey KT (2005). The ADH1C polymorphism modifies the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck associated with alcohol and tobacco use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 476-482.

Piccinin S, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Maestro R, Boiocchi M (1998). Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. *Br J Cancer* **78**, 1147-1151.

Ponder BAJ (2001). Cancer genetics. *Nature* **411**, 336-341.

Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, Young J, Jenkins MA, Hopper JL, Baron JA, Buchanan D, Casey G, Levine AJ, Le Marchand L, Gallinger S, Bapat B, Potter JD, Newcomb PA, Haile RW, Laird PW (2008). Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation,

immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 3208-3215.

Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E (2005). Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* **26**,12-17.

Ragin CC, Taioli E (2007). Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* **121**, 1813-1820.

Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ochoa-Carrillo FJ, Cuapio-Ortiz A, Frias-Mendivil M, Meneses-Garcia A, Sanchez-Mejorada G (1995). Cancer of the mobile tongue in Mexico. A retrospective study of 170 patients. *Eur J Cancer B Oral Onco* **31**, 37-40.

Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG (2004). PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* **30**, 302–308.

Rennie JS, MacDonald DG, Dagg JH (1984). Iron and the oral epithelium: a review. *J R Soc Med* **77**, 602-607.

Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, Favrot MC (2007). Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res* **13**, 1179-1185.

Rizo Ríos P, Sierra-Colindres MI, Vázquez-Piñon G, Cano-Guadiana M, Menes-García A, Mohar A (2007). *Cancerología* **2**, 203-287.

Robertson KD (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* **6**, 597-610.

Roman A, Fife KH (1989). Human papillomaviruses: are we ready to type? *Clin Microbiol Rev* **2**,166–190.

Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D (2001). Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-

methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* **61**, 939-942.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Samowitz WS, Slattery ML, Porfiri E, Scartozzi M, Piga A, Cellerino R (2002). Missense repair gene alterations, microsatellite instability, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* **20**, 3178-3179.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D (2000). Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* **15**, 892-895.

Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE (2004). Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* **111**, 224-228.

Secretaria de Salud, Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones: tabaquismo en México, 2003.

Secretaria de Salud, Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones: alcoholismo en México, 2003.

Schofield MJ, Hsieh P (2003). DNA Mismatch repair mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57**, 579-608.

Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA (1998). Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1626-1636.

Scully C (2002). Oral squamous cell carcinoma; from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology* **38**, 227-234.

Scott JM (1999). Folate and vitamin B₁₂. *Proc Nutr Soc* **58**, 441-448.

Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S (2007). Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer* **109**, 703-712.

Sharma P, Saxena S, Aggarwal P (2010). Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: an institutional study. *Indian J Dent Res* **21**, 316-319.

Shia J, Ellis NA, Klimstra DS (2004). The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* **445**, 431-441.

Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, Das BC (2009). Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res* **130**, 222-233.

Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2007). Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 836-840.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004). Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* **108**, 766-772.

Smith EM, Summersgill KF, Allen J, et al.(2000) Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **109**, 1069–1076.

Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH (1998). Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* **108**, 1098-1103.

Spitz M, Santella R, Boffetta P, Buffler P: Subgroup Report: head and neck cancer. World Health Organization (WHO). Mechanisms of Carcinogenesis—contribution of Molecular Epidemiology. IARC Scientific Publications N. 157: 41-47, Lyon, IARC Press, 2004.

- Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH (2009). Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **22**, 1519-1526.
- Strathdee G, Brown R (2002). Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med* **4**, 1-17.
- Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL (2002). Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* **8**, 1093-1100.
- Summersgill KF, Smith ME, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP (2001). Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **92**, 62-69.
- Syrjänen S (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virology* **32**, 59-66.
- Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* **12**, 418-424.
- Szankasi P, Smith GR (1995). A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction. *Science* **267**, 1166-1169.
- Taiolli E (2008). Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis* **29**, 1467-1474.
- Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R (2009). Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. *Curr Genomics* **10**, 336-352.
- Tanti P, Zapparore R, Migliora P, Spinillo A, Belloni C, Carnevali L (1999). Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol* **93**, 475-479.

Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Tada A, Shiiba M, Tanzawa H (2005). Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* **15**, 597-602.

Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87**, 65-73.

United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, World Health Organization (1999). Health Effects of Interactions Between Tobacco Use and Exposure to Other Agents. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Van Heerden WF, Raubennheimer EJ, Schoub BD (1996). Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas from an African population sample. *Anticancer Res* **16**, 969-973.

Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM (1996). Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* **110**, 1020-1027.

Venuti A, Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Rahimi S, Vigili M (2004). Presence of HPV in head and neck tumours: high prevalence in tonsillar localization. *J Exp Clin Cancer Res* **23**, 561-566.

Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G (2003). Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **105**, 41-46.

Vlajinac HD, Marinkovic JM, Sipetic SB, Andrejic DM, Adanja BJ, Stosic-Divjak SL (2006). Case-control study of oropharyngeal cancer. *Cancer Detect Prev* **30**, 152-157.

Wang JS, Guo M, Montgomery EA, Thompson RE, Cosby H, Hicks L, Wang S, Herman JG, Canto MI (2009). DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* **104**, 2153-2160.

Wang J, Sasco AJ, Fu C, Xue H, Guo G, Hua Z, Zhou Q, Jiang Q, Xu B (2008). Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 118-125.

Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H, Niemelä O (2008). Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med* **37**, 157-165.

Watanabe S, Watanabe R, Oton-Leite AF, Alencar Rde C, Oliveira JC, Leles CR, Batista AC, Mendonça EF (2010). Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci* **52**, 417-424.

Watts JM (1961). The importance of the Plummer-Vinson syndrome in the aetiology of carcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Postgrad Med J* **37**, 523-533.

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* **24**, 736-747.

Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM (2008). Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **14**, 366-369.

Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* **21**, 1510-1517.

Wolach B, Rothschild M, Pomeranz A, Raz A, Ben Arush M, Rathaus V, Bernheim J, Novis B, Katz S (1998). Idiopathic non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy, vitamin

B12 deficiency and gastric adenocarcinoma: an unreported association in a teenager. *Eur J Pediatr* **157**, 715-718.

Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, Urba SG, Eisbruch A, Teknos TN, Chepeha DB, Prince ME, Tsien CI, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Mason HL, Miller TH, Wallace NE, Bradford CR, Carey TE (2008). Chemo selection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol* **26**, 3138-3146.

World Health Organization (2008). Report on the Global Tobacco Epidemic: The MPOWER package. Geneva, World Health Organization.

World Health Organization (1992). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems Vol. 1 (10th rev.) Geneva, Switzerland.

Xiong Z, Laird PW (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* **25**, 2532-2534.

Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel W (2006). Histologic features distinguish microsatellite-high microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of MLH1 promoter. *Human Pathology* **37**, 831-838.

Zuo C, Zhang H, Spencer HJ, Vural E, Suen JY, Schichman SA, Smoller BR, Kokoska MS, Fan CY (2009). Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* **141**, 484-490.

14. ANEXOS

Áreas topográficas de la mucosa bucal

El examen bucal se llevará a cabo de acuerdo al siguiente orden topográfico:

1. Mucosa labial superior e inferior

Área de la mucosa bucal que se extiende del borde bermellón a 1 cm. de la parte más profunda del surco bucal y lateralmente a una línea trazada verticalmente a los ángulos de la boca.

2. Surco bucal superior e inferior

Área entre la línea mucogingival y una línea imaginaria que corre paralela y que está ubicada a 1 cm. de la mucosa bucal.

3. Mucosa bucal derecha e izquierda

Parte interna de los carrillos limitada por los surcos bucales superior e inferior y anteriormente por la mucosa labial.

4. Frenillo labial superior e inferior

Banda continua de tejido blando entre la línea media que une a la mucosa labial con la mucosa alveolar.

5. Paladar duro

Área triangular comprendida entre el proceso alveolar superior y limitado posteriormente por la unión con paladar blando.

6. Paladar blando

Área limitada en su parte anterior por la unión con paladar duro y en la parte posterior con los pilares anteriores, amigdalinos e incluyendo la úvula.

7. Amígdalas

Tejido linfoide localizado por detrás de los pilares anteriores del istmo de las fauces.

8. Base del dorso de la lengua

Área rectangular a la V lingual y entre los dos pilares anteriores.

9. Tercio medio lingual

Área triangular posterior a la punta de la lengua limitada atrás por el surco terminal y a los lados por los bordes laterales linguales.

10. Punta de la lengua

Área circular con un radio aproximadamente de 1 cm., ubicado en la parte más anterior de la misma.

11. Bordes laterales derecho e izquierdo

Área rectangular que comienza posterior a la punta de la lengua, se extiende atrás y cubre un centímetro del borde dorsal y ventral de la lengua

12. Superficie ventral de la lengua

Superficie inferior de la lengua, limitada lateralmente por los bordes de la lengua e inferiormente por el piso de la boca.

13. Piso de boca

Área triangular cuyo vértice está localizado en el frenillo lingual y cuya base está formada por un área comprendida por la línea marginal que va de las caras distales de los caninos inferiores.

14. Frenillo lingual

Banda continua de tejido blando localizada en la línea media, y que une a la parte central de la lengua con el piso de la boca.

15. Encía libre

Parte coronaria no insertada que rodea al diente a modo de manguito y forma el surco gingival.

16. Encía adherida

Limitada por la unión mucogingival y por la línea del surco gingival libre.

Relación del estado de metilación del gen *hMLH1* con la expresión de su proteína, y su asociación con tabaco, alcohol e infección por VPH-16 en cáncer bucal y orofaríngeo. Estudio de casos y controles.

CASOS

DATOS GENERALES

Caso ()	Institución: _____	Fecha: _____	ID: _____
Nombre del paciente: _____			
Expediente: _____	Género: _____	Edad: _____ (_ / _ / _)	

CONSUMO DE TABACO

<ul style="list-style-type: none">• No fumador ()• Fumador () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Con filtro () Sin filtro ()
Cantidad de cigarrillos por día _____
Paquete de 20 cigarrillos por año _____ Total de consumo _____
<ul style="list-style-type: none">• Ex fumador () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Con filtro () Sin filtro ()

CONSUMO DE ALCOHOL

<ul style="list-style-type: none">• No bebedor ()• Bebedor () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Cantidad unidades de bebida (UB) por semana _____
Consumo de UB por año _____ Total de consumo _____
<ul style="list-style-type: none">• Bebedor () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Cantidad unidades de bebida (UB) por semana _____
Consumo de UB por año _____ Total de consumo _____
Vino () Licor () Tequila () Cerveza () Pulque () Mezcal () Otros _____

EXAMEN BUCAL

Lesión básica: _____ Forma: _____ Tamaño: _____ Color: _____

Numero: _____ Superficie: _____ Consistencia: _____

Localización: _____ Extensión: _____

Sintomatología asociada: _____

Fecha de inicio: _____ Tiempo de evolución: _____

ESTADIFICACION AJCC

T- TUMOR PRIMARIO	
TX	Sin criterio para su determinación
T0	Sin evidencia de tumor
Tis	Ca <i>in situ</i>
T1	< 2 cm
T2	2 a 4 cm
T3	> 4 cm
T4	> 4 cm invasivo

N-NODULOS LINFATICOS REGIONALES	
NX	Sin criterio para su determinación
N0	Sin evidencia de tumor
N1	Unilateral < 3 cm
N2a	Unilateral, único de 3 a 6 cm
N2b	Unilateral, múltiple > 6 cm
N3a	Múltiples uni, bi o contralaterales
N3b	Bilaterales, únicos o múltiples > 6 cm
N3c	Contralateral único

ESTADO DEL PACIENTE	
H0	Actividad normal
H1	Sintomático ambulatorio
H2	Ambulatorio 50% sin asistencia
H3	Ambulatorio 50% con asistencia
H4	Necesita hospitalización

ESTADIFICACION GRUPAL	
1	T1,N0,M0
2	T2,N0,M0
3	T3,N0,M0
	T1,T2,T3,N1,M0
4	T4,N0 o N1,M0
	Cualquier T, N2 o N3, M0
	Cualquier T, Cualquier N, M1

G- GRADO TUMORAL	
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobremente diferenciado

M-METASTASIS A DISTANCIA	
MX	No evidencia clínica
M0	Sin metástasis
M1	Con metástasis a sitios específicos

Relación del estado de metilación del gen *hMLH1* con la expresión de su proteína, y su asociación con tabaco, alcohol e infección por VPH-16 en cáncer bucal y orofaríngeo. Estudio de casos y controles.

CONTROLES

DATOS GENERALES

Control () Institución: _____ Fecha: _____ ID: _____
Nombre del participante: _____
Expediente: _____ Género: _____ Edad: _____ (_ / _ / _)

CONSUMO DE TABACO

No fumador ()
 Fumador () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Con filtro () Sin filtro ()
Cantidad de cigarrillos por día _____
Paquete de 20 cigarrillos por año _____ Total de consumo _____
 Ex fumador () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Con filtro () Sin filtro ()

CONSUMO DE ALCOHOL

No bebedor ()
 Bebedor () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Cantidad unidades de bebida (UB) por semana _____
Consumo de UB por año _____ Total de consumo _____
 Bebedor () Edad de inicio _____ Duración del hábito _____
Cantidad unidades de bebida (UB) por semana _____
Consumo de UB por año _____ Total de consumo _____
Vino () Licor () Tequila () Cerveza () Pulque () Mezcal () Otros _____

Examen bucal: _____
Antecedentes familiares: _____
Información adicional: _____

15. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

- Imelda González-Ramírez, Claudia García-Cuellar, Velia Ramírez-Amador, Esther Irigoyen-Camacho, Yesennia Sánchez-Pérez, Gabriela Anaya-Saavedra, Martín Granados-García. **El silenciamiento del gen hMLH1 por etilación es un evento epigenético temprano en la carcinogénesis bucal.** 1° Reunión Institucional de Investigación, México, D.F. 26 noviembre 2010.
- González-Ramírez I, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, García-Vázquez F, García-Cuellar C. **Promoter methylation status and protein expression in the mismatch repair gene hMLH1 in oral squamous cell carcinoma.** III Simposio Internacional “Avances en Cáncer Oral”, País Vasco, España, 18 y 19 de noviembre 2010.
- Imelda González-Ramírez, Claudia García-Cuellar, Velia Ramírez-Amador, Esther Irigoyen-Camacho, Yesennia Sánchez-Pérez, Gabriela Anaya-Saavedra, Martín Granados-García. **La metilación del promotor del gen hMLH1 y la ausencia de expresión de su proteína es un evento temprano en el desarrollo de cáncer bucal.** 15° Encuentro Nacional de Investigadores, Acapulco-Guerrero, México, 27-30 octubre 2010.
- I. González-Ramírez, V. Ramírez-Amador, C. García-Cuellar, Y. Sánchez-Pérez, G. Anaya-Saavedra, E. Irigoyen Camacho. **Promoter methylation and Protein expression of hMLH1 gene in oral cancer. Preliminary report.** The 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology. Toronto, Canada, 8-11 July 2009.

16. PUBLICACIONES

- González-Ramírez I, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, García-Vázquez F, García-Cuellar CM. **hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer.** Oral Oncol 2010.
- García-Cuellar C, González-Ramírez I, Granados-García M. **VPH y los carcinomas de cavidad bucal y bucofaringe.** Cancerología 2009; 4: 181-191.



hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer

I. González-Ramírez^{a,b}, V. Ramírez-Amador^b, M.E. Irigoyen-Camacho^b, Y. Sánchez-Pérez^a, G. Anaya-Saavedra^b, M. Granados-García^a, F. García-Vázquez^c, C.M. García-Cuellar^{a,*}^a Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, San Fernando 22, Tlalpan, 14080 México City, Mexico^b Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, 04960 México City, Mexico^c Instituto Nacional de Pediatría, Laboratory of Molecular Pathology, Insurgentes Sur 3700, Coyoacán, 04530 México City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2010

Received in revised form 4 October 2010

Accepted 5 October 2010

Available online xxx

Keywords:

Oral squamous cell carcinoma

hMLH1 methylation

SUMMARY

Promoter methylation is believed to inactivate the expression of hMLH1. This process has been implicated in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Thus, the aim of this study was to determine the profile of hMLH1 methylation and protein expression in OSCC. The matched case-control study included 50 OSCC cases and 200 controls, with a median of age 64 (Q₁–Q₃ 54–71) years. Protein expression was determined by immunohistochemical staining, and hMLH1 gene promoter methylation was analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). A conditional logistic regression model for risk factors was built for OSCC cases and matched controls. Promoter methylation of hMLH1 was detected in 38 (76%) OSCC cases, but in none of the control samples. Of the 38 OSCC samples with promoter methylation, 12 (32%) were negative for hMLH1 protein, and corresponded to early clinical stages (10 in stage II and 2 in stage I). All 12 unmethylated samples showed positive stain for hMLH1. Multiple logistic regression analysis showed an OR of 16.54 (IC 95%: 1.69–161.68, $p = 0.016$) for methylation of the hMLH1 gene and early stages of OSCC, adjusting by gender and tobacco use. This study showed a high frequency of hMLH1 promoter methylation that occurred in most of the early stage cases and in about half of the late stage cases. It is proposed that hMLH1 promoter methylation is an early event that is maintained during tumor progression.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC), the eighth most common cancer among men and the thirteenth most common among women in the world,¹ constitutes <1% of all malignant neoplasias in Mexico.² Recently, an analysis of oral and oropharyngeal cancer mortality trends in Mexico reported that during 1979–2003, 15,576 deaths attributable to this malignancy occurred.³ The most important risk factors for OSCC development are tobacco and alcohol consumption.⁴

Carcinogenesis is a complex process, characterized by the accumulation of genetic⁵ and epigenetic alterations.⁶ Several studies have reported a direct association between inactivation of the hMLH1 gene by promoter methylation and gastric,⁷ hepatic,⁸ breast,⁹ and esophageal cancer (EC).¹⁰ The hMLH1 gene belongs to the human DNA mismatch repair (hMMR) system, and is essential in reducing the accumulation of mutations and maintaining genomic stability.¹¹ The methylation status and protein expression of hMLH1 has been analyzed also in head and neck cancer (HNC)^{12–16}; nevertheless, few studies have analyzed it in

OSCC.^{17,18} The aim of this study was to determine the methylation and protein expression of hMLH1 in OSCC and their correlation with clinical parameters.

Materials and methods

Study design

The case-control study was conducted from December 2007 to December 2009 at the Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Hospital General Dr. Manuel Gea González (DMG), and Clínica Esromatológica Rafael Lozano (CERL) of the Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City. The study was approved by the Ethics Committee of each participating; every participant provided an informed written consent before his/her participation in enrollment. The study design (inclusion and exclusion criteria), and laboratory procedures (sample collection and DNA extraction) were based on a previous study performed by our research group.¹⁹

Study subjects

Fifty patients with newly diagnosed, histologically confirmed OSCC, who attended an oncological referral center in Mexico City

* Corresponding author. Address: San Fernando No. 22, Tlalpan, 14080 México, D.F., México. Tel.: +52 55 5628 0462; fax: +52 55 5628 0432.

E-mail address: claudia.garcia@salud.gob.mx (C.M. García-Cuellar).

(INCan), were included in this study. Eligible OSCC patients had not received any previous treatment (chemotherapy, radiotherapy, and/or surgery). Patients with a history of a malignant neoplasia were excluded. Oral cancer was defined according to the International Classification of Diseases and comprised malignancies of the tongue, gingiva, floor of the mouth, palate, buccal mucosa, and retromolar area (ICD-10 rubrics C01–C06).⁴⁹ The clinical stage (TNM) was defined according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) criteria.²¹

Two hundred controls (matched by gender and age [± 5 years]) were selected from two sources: the Ophthalmology Service of the Hospital General DMGG, and the dental clinic CERL. In both control groups, exclusion criteria comprised a personal history of any type of cancer, as well as the presence of potentially malignant oral disorders.

Data collection

A questionnaire that included demographic characteristics (age and gender), history of tobacco use and alcohol consumption, and family history of cancer was applied to cases and controls. Tobacco and alcohol variables were measured according to a previous study.¹⁹ Family history of cancer included first- and second-line relatives. In OSCC patients, data related to shape and size of the lesion, and clinical stage were also registered.

Sample collection and DNA extraction

Cytological brushing for DNA collection was performed in cases from the OSCC site, and in controls from the oral location of their corresponding case. Using a commercially available nylon conical cytobrush (Lanceta HC, México), samples were taken applying gentle pressure: the brush was repeatedly rotated over the oral mucosa.

In OSCC patients, an incisional biopsy was performed and divided into two sections, one for histopathological and immunohistochemical studies, and the other for DNA assays.

All tissue and cytological samples were maintained in PreceivCyt solution (Cytoc Corporation, Marlborough, MA, USA) and frozen at -20°C until analysis. DNA was purified using the Wizard Genomic-DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, the samples were incubated at 65°C for 4 h with nuclear lysis solution and $20\ \mu\text{L}$ of proteinase K ($20\ \text{mg/mL}$); an additional incubation was performed for 30 min at 37°C with $3\ \mu\text{L}$ of RNase solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All samples were quantified with a spectrophotometer. In order to verify the DNA integrity, the constitutive β -globin gene was amplified using the primers PCO4 (5'-CAACTTCATCCACCTTACC-3') and GH20 (5'-GAAGACCAAG-GACAGGTAC3').¹²

DNA bisulfite modification and methylation-specific-PCR (MSP)

Methylation-specific PCR (MSP) was used to identify DNA methylation patterns within the CpG Islands of hMLH1.²³ DNA was modified with sodium bisulfite with the EZ-DNA methylation™ Kit (Zymo Research, Orange CA, USA), according to manufacturer's protocol. Amplification of the hMLH1 gene for methylated reaction was done using the primer sequence 5'-ACGTAGACGTTTATTAGG GTCCG-3' (sense) and 5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3' (antisense); for unmethylated reaction through the primers 5'-TTTTGATG-TAGATGTTTTATTAGCGTTGT-3' (sense) and 5'-ACCACCTCATCATAA CTACCACA-3' (antisense), as described.²⁴

The PCR conditions were similar except for the annealing temperature for methylated (59°C) and unmethylated reactions (57°C). The colon cancer cell line SW48, obtained from the American

Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), was used as methylated control.²³ DNA from normal lymphocytes was used as unmethylated control.²³ A mix that contained all the PCR reagents except DNA was included as negative control. Each PCR product was directly loaded onto 2% agarose gel, visualized under UV illumination. The resultant PCR amplicon size was 182 base pairs (bp) for methylated and 124 bp for unmethylated DNA.

Immunohistochemical staining

In the OSCC samples, immunohistochemical (IHC) staining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues sectioned at $5\text{-}\mu\text{m}$ intervals, using a monoclonal antibody against hMLH1 protein (PharMingen, San Diego, CA, USA) at a 1:50 dilution. The epithelium obtained from oral fibrous hyperplasia was used as positive control. Photomicrographs ($40\times$) were taken, with a camera (Olympus C-7070 Olympus Imaging America Inc., Melville, NY, USA), from five randomly selected fields per case. Each image was transferred to a grid and the number of cells counted. The labeling index was expressed as the percentage of positive cells (number of positive tumor cells/total number of tumor cells) in each case studied, according to a previous study.²⁶

Statistical analysis

Demographic data of the patients and controls were described as frequencies and means for categorical and continuous variables, respectively. Current and former tobacco and alcohol categories were grouped as positive habit. Conditional logistic regression analysis was carried out for the matched OSCC cases and controls. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) were constructed, fitting in both bivariate and multivariate models. Dummy variables were used to estimate ORs for categorical variables of exposure.

The DNA methylation findings were reported as a dichotomous variable. Unconditional logistic regression was used to estimate the association between DNA methylation status and selected independent variables, at a significant level of $p < 0.05$. The statistical analysis was carried out using the STATA program v.10 (Stata Corporation LP, College Station, TX, USA).

Results

A total of 250 subjects were enrolled in this matched case-control study (50 cases and 200 controls). Fifty OSCC patients were included: 25 women with a median age of 67 (Q_1 – Q_3 , 57–69) years, and 25 men with a median age of 60 (Q_1 – Q_3 , 48–71) years. The two hundred controls included 100 women with a median age of 65 (Q_1 – Q_3 , 56–70 years) and 100 men with a median age of 61 (Q_1 – Q_3 , 49–72 years).

Clinical characteristics of OSCC patients are summarized in Table 1. As expected, tobacco and alcohol use was strongly associated with OSCC (52% cases vs. 21% controls, and 46% cases vs. 14% controls, $p < 0.0001$, respectively). An association between OSCC and family history of cancer was identified ($p = 0.002$). Table 2 shows the results of the multiple conditional logistic regression model: the adjusted ORs indicate that smokers and alcohol consumers were 2.89 and 3.86 times more likely to present OSCC, respectively. In addition, family history of cancer was associated with OSCC (OR 2.28).

Promoter methylation analysis for the hMLH1 gene

Promoter methylation of hMLH1 gene was detected in 38 (76%) OSCC cases; all 200 control samples were unmethylated. A significant

Table 1
Clinicopathological characteristics of patients with oral squamous cell carcinoma.

Characteristics	Patients (n = 50)	
	n	%
Site		
Tongue (lateral borders)	31	(62)
Gingiva	16	(32)
Palate	2	(4)
Buccal mucosa	1	(2)
Shape		
Tumor with ulceration	20	(40)
Tumor	17	(34)
Ulcer	13	(26)
Nodal stage		
N0	32	(64)
N1	18	(36)
Tumor stage		
T1/2 (<2–4 cm)	26	(52)
T3/4 (>4 cm)	24	(48)
Clinical stage		
I/II (early)	19	(38)
III/IV (advanced)	31	(62)
Histological grade		
Well differentiated	46	(92)
Moderately/poorly differentiated	4	(8)

an OR of 16.54 (IC 95%; 1.69–161.68, $p = 0.016$) for hMLH1 methylation and early stages of the disease, adjusted by gender and tobacco use.

hMLH1 protein expression

Expression of hMLH1 protein was absent in 12 (24%) of the 50 OSCC samples analyzed. As shown in Table 3, all samples that showed negative expression of hMLH1 protein corresponded to nodal stage N0 ($p = 0.002$). The 12 OSCC samples that were negative for hMLH1 protein corresponded to early clinical stages, in contrast with the 7 (18%) positive cases that were in early stages of the disease ($p < 0.0001$). No significant differences were found between methylated and unmethylated samples according to tobacco use ($p = 0.100$), alcohol consumption ($p = 0.183$), family history of cancer ($p = 0.514$), histological grade ($p = 0.560$), or nodal stage ($p = 1.000$).

The hMLH1 staining in OSCC was predominately nuclear (Fig. 1B). The median of the percentage of positive stained cells in the samples examined was significantly higher in well differentiated OSCC than in moderately or poorly differentiated samples (84.2%, Q_1 – Q_3 , 79%–88% vs. 61.5%, Q_1 – Q_3 , 55%–62%) ($p = 0.004$). No association was detected between the percentage of positive stained cells and the methylation condition ($p = 0.851$).

Discussion

This study analyzed the methylation status of hMLH1 in 50 patients with newly diagnosed OSCC, from a reference hospital in Mexico City, and in 200 age- and gender-matched controls. Similarly to others studies,^{19,27} tobacco and alcohol consumption was associated with OSCC.

A strong association between hMLH1 methylation and OSCC was observed; methylation was identified in 76% of OSCC cases, in contrast with the total absence of hMLH1 methylation in the control group. The overall hMLH1 methylation rate observed in our study was higher than the 8% and 17% reported in OSCC,^{17,18} the 23% and 50% in HNC,^{15,28} or the 3% and 33% estimated for EC^{10,29}; but it was similar to recent reports on EC (62%)³⁰ and HNC (69%).¹² In contrast, Liu et al.¹⁶ have reported a higher frequency (92%) of hMLH1 methylation in HNC. The wide range of methylation values reported in the hMLH1 gene could be attributed to differences in patients' characteristics, and the diverse validity of the techniques used to identify methylation events.

In this study, a significant association between hMLH1 methylation and females was revealed, comparable to Czerninski et al.¹⁷ Methylation of hMLH1 occurred similarly more frequently in women with gastric cancer ($p < 0.05$).¹¹

In concordance with recent reports,^{10,14,32} hMLH1 methylation in HNC and EC was not associated with tobacco or alcohol consumption. Nevertheless, Sengupta et al.²⁸ found that a significant proportion (64%) of smokers exhibited hMLH1 methylation, compared with non-smokers (35%) ($p = 0.001$) in HNC.

The study design used in the current study is appropriate for low incidence diseases, such as OSCC; however, this type of design has limitations: the participants were not followed; therefore it was not possible to establish the progression of epigenetic changes from early to advanced stages. Nevertheless, the results indicate that hMLH1 methylation occurred in the majority (95%) of the early stage cases and in about a half of the advanced cases: the logistic regression model, adjusted for tobacco and gender, showed a 16.28 OR, indicating that early stage patients were more likely to show hMLH1 methylation. Thus, our findings suggest that methylation of hMLH1 is an early event, probably maintained during tumor progression.

Table 2
Crude and adjusted OR for selected risk factors in matched oral squamous cell carcinoma cases and controls.

	Crude OR ^a (95% CI)	<i>p</i>	Adjusted OR ^b (95% CI)	<i>p</i>
Tobacco use				
No	1.00			
Yes ^c	6.57 (2.76–15.65)	<0.0001	2.89 (1.03–8.09)	0.042
Alcohol use				
No	1.00			
Yes ^d	9.30 (3.66–23.61)	<0.0001	3.86 (1.30–11.48)	0.015
Family history of cancer				
Negative	1.00			
Positive	3.20 (1.62–6.33)	0.001	2.28 (1.05–4.93)	0.036

^a Conditional logistic regression OR.

^b Adjusted by family history of cancer, tobacco use, and alcohol consumption.

^c Including current and former tobacco smokers.

^d Including current and former alcohol drinkers.

higher percentage of methylation was found in women (23% or 60%) than in men (15% or 40%) ($p = 0.018$). Fig. 1A shows the methylation status of hMLH1 by MSP in representative samples of cases and controls.

As shown in Table 3, 11 (92%) unmethylated samples were in advanced stages of the disease ($p = 0.018$). All 12 unmethylated samples showed positive stain for hMLH1; of the 38 methylated samples, 26 (68%) were positive for hMLH1 protein expression. It is interesting to note that 12 (32%) of the 38 OSCC hMLH1 methylated samples showed negative stain for hMLH1, and corresponded to early clinical stages (10 samples in stage II and two samples in stage I). No significant differences were found between methylated and unmethylated samples according to tobacco use ($p = 0.100$), alcohol consumption ($p = 0.183$), family history of cancer ($p = 0.514$), histological grade ($p = 0.560$), and nodal stage ($p = 1.000$).

The bivariate analysis did not show a significant association between methylation and alcohol consumption ($p = 0.108$) or family history of cancer ($p = 0.414$). A marginally significant association was detected with gender ($p = 0.055$) and tobacco use ($p = 0.078$). The results of the multiple logistic regression analysis revealed

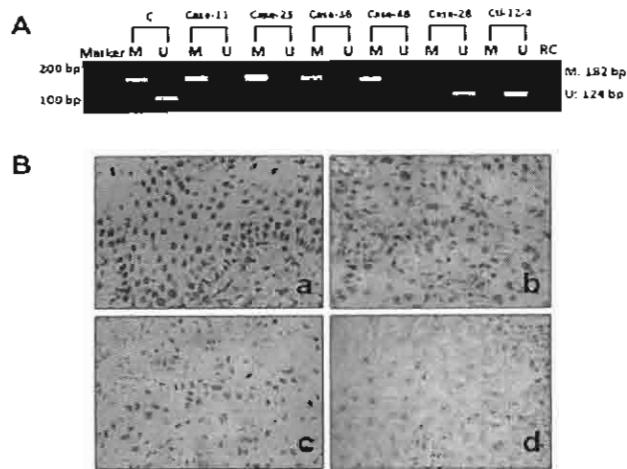


Figure 1 (A) Representative examples of MSP for OSCC. Lanes (M) and (U) correspond to methylated and unmethylated reactions, respectively. (C) Controls SW48 cell line methylated control, and normal lymphocytes unmethylated control, (RC) reagents control of PCR: cases 11, 23, 36, and 48 were methylated samples; case 28 and ctrl-control 12–4 were unmethylated samples. (B) Immunohistochemical staining of hMLH1. (a) Positive control showing intense nuclear staining of epithelial cells from oral fibrous hyperplasia. (b and c) Nuclear expression in neoplastic epithelial cells from OSCC. (d) Negative expression of hMLH1 in OSCC. Original magnification 400x.

Table 3

Clinicopathological characteristics according to hMLH1 methylation status and protein expression in oral squamous cell carcinoma cases.

	hMLH1 methylation status				<i>p</i> ^a	Immunostaining				<i>p</i> ^a
	Methylated (n = 38)		Unmethylated (n = 12)			Positive (n = 38)		Negative (n = 12)		
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Nodal stage										
N0	24	(63)	8	(67)	20	(53)	12	(100)		0.002
N1	14	(37)	4	(33)	18	(47)	0	(0)		
Tumor stage										
T1/T2 (<2–4 cm)	24	(63)	2	(17)	14	(37)	12	(100)		<0.0001
T3/T4 (>4 cm)	14	(37)	10	(83)	24	(63)	0	(0)		
Clinical stage										
I, II	18	(47)	1	(8)	7	(18)	12	(100)		<0.0001
III, IV	20	(53)	11	(92)	31	(82)	0	(0)		
Protein expression										
Negative	12	(32)	0	(0)						0.047
Positive	26	(68)	12	(100)						

^a *p* = Fisher's exact test.

Previous studies^{19,73,14} have not identified a relationship between methylation of hMLH1 and clinical stages. However, in EC, Tzao et al.³⁰ described the association between methylation ($p = 0.024$) and suppressed hMLH1 expression ($p < 0.0001$) in early clinical stages, suggesting that the loss of hMLH1 protein by methylation is an early event. On the other hand, no significant correlation between clinical stages and methylation status has been reported in other DNA repair genes, such as hMSH2 and MGMT in oral, head and neck, and EC.^{10,27,28}

A reduced protein expression associated with hMLH1 methylation in HNC³³ and EC³⁰ has been reported. However, in this study, a mismatching between methylation and protein expression of hMLH1 was exhibited: 68% methylated cases demonstrated positivity for hMLH1 protein expression. This mismatching has also been reported by Liu et al.,¹³ who indicated that promoter methylation did not correlate with hMLH1 expression. Moreover, Czerninski et al.¹⁷ did not find matching between the expression of the gene and the methylation status in two patients with OSCC who were moderately positive for hMLH1 protein and

demonstrated methylation. A lack of an unequivocal association between the methylation status and protein immunohistochemical staining may be attributed to the fact that silencing of one allele by methylation does not necessarily affect the protein expression of another unmethylated allele; an alternative explanation could be related to the genetic events involved in hMLH1 gene mutation.¹⁷

In this study, the methylation profile was analyzed by MSP a simple, sensitive, and specific method for determining the methylation status of virtually any CpG-rich genomic region. This technique is noticeably more sensitive than Southern blot analysis, facilitating detection of low numbers of methylated alleles and DNA analysis from small samples.²³ It is essentially considered a qualitative, rather than a quantitative method.³⁴ A technique that can provide a more precise analysis for most CpG sites within a defined region is genomic sequencing.²⁵ Deng et al.²⁵ through genomic sequencing, identified key methylated sites in the promoter region that inhibited hMLH1 expression in colorectal cancer cell lines, thus explaining partially the mismatching detected in this and other studies.^{15,17}

It is important to highlight that in the 200 control samples, hMLH1 promoter was found unmethylated, in accordance with other studies^{10,17,30} that have analyzed normal tissues. The presence of hMLH1 unmethylated in all control samples could indicate that the methylation of hMLH1 represents a specific marker of malignancy.

In conclusion, our results suggest that hMLH1 methylation is a common finding in OSCC, signifying that the loss of hMLH1 gene is probably involved in the tumorigenesis of this cancer. Promoter methylation is one of the mechanisms responsible for the inactivation of hMLH1 protein expression and it is a potential molecular marker for OSCC. Further research is required to elucidate this aspect, including analysis of other DNA MMR genes, and study of potentially malignant oral disorders and OSCC samples. Genomic sequencing could bring a better understanding of the role of the MMR system in the carcinogenesis of OSCC.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgments

This research is the result of a research project by Dr. González-Ramírez to obtain the Ph.D. degree in the Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Autónoma Metropolitana. We thank the staff of the Basic Research and Head and Neck service of the INCan and, most importantly, the patients enrolled in this study. This work was supported by CONACyT-Mexico grants 45987-M, 43183-M, AC-2006-52830, and CB-81745. Doctoral Fellowship to Imelda González-Ramírez from CONACyT (212982).

References

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74–108.
- Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades. Coordinación de Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compensación Morbilidad y Morbilidad; 2005.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Zimbrón-Ruiz A, Zepeda-Zepeda MA. Oral and pharyngeal cancer mortality in Mexico, 1979–2003. *J Oral Pathol Med* 2008;37(1):11–7.
- Hishibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(10):777–89.
- Little MP. Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct* 2010;5:19.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358(11):1148–59.
- Kim HC, Lee S, Kim DY, Ryu SY, Joo JK, Kim JC, et al. Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: a comparison with younger patients. *J Surg Oncol* 2010;101(1):28–35.
- Li B, Liu W, Wang L, Li M, Wang J, Huang L, et al. CpG island methylator phenotype associated with tumor recurrence in tumor-node-metastasis stage I hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010;17(7):1917–26.
- Karray-Chouayekh S, Trifil F, Khaibz A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, et al. Clinical significance of epigenetic inactivation of hMLH1 and BRCA1 in Tunisian patients with invasive breast carcinoma. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:369129.
- Wang J, Sisco AJ, Fu C, Kue H, Guo G, Hua Z, et al. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(1):18–25.
- Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 1994;266(5193):1956–60.
- Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009;22(6):1519–26.
- Zuo C, Zhang H, Spencer HJ, Vural E, Suen JY, Schichman SA, et al. Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141(4):484–90.
- Demokan S, Suoglu Y, Demir D, Gozeler M, Dalay N. Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann Oncol* 2006;17(6):995–9.
- Liu K, Zuo C, Luo QK, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promoter hypermethylation and inactivation of hMLH1, a DNA mismatch repair gene, in head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2003;12(1):50–6.
- Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promoter hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;126(5):548–53.
- Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009;15(3):206–13.
- Viswanathan M, Tsuchida N, Shannugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;105(1):41–6.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study in Mexico City. *Arch Med Res* 2008;39(2):189–97.
- International statistical classification of diseases and related health problems. 10th revision. Geneva: World Health Organization; 1992.
- American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 5th ed. Chicago: Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350–4.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(18):9821–6.
- Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* 2000;60(17):4864–8.
- Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999;59(9):2029–33.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, García Vázquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol* 2008;44(8):805–11.
- Supic G, Kozomara R, Brankovic-Magic M, Jovic N, Magic Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009;45(12):1051–7.
- Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer* 2007;109(4):703–12.
- Gao M, Ren J, House MG, Qi Y, Brock MV, Herman JG. Accumulation of promoter methylation suggests epigenetic progression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4515–22.
- Tzao C, Hsu HS, Sun GH, Lai HL, Wang YC, Tung HJ, et al. Promoter methylation of the hMLH1 gene and protein expression of human mutL homolog 1 and human mutS homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(5):1371–8.
- Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, et al. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005;20(2):236–41.
- Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2005;26(1):12–7.
- Nunn J, Nagini S, Risk JM, Prime W, Moloney P, Liloglou T, et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2003;39(2):115–29.
- Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25(12):2432–4.

VPH y los Carcinomas de Cavidad Bucal y Bucofaringe

Claudia M. García-Cuellar¹, Imelda del Carmen González Ramírez² y Martín Granados García³

¹Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.

²Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana

³Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello, Instituto Nacional de Cancerología

Abstract

Upper aero-digestive tract cancer (UADTC) is the sixth most common cancer with an annual incidence of approximately 400,000 worldwide. Although the principal risk factors for UADTC remain tobacco and alcohol use, human papillomavirus (HPV) has recently been found to be etiologically associated with 20 to 25% of UADTC, mostly in the oropharynx. HPV causes human cancers by expressing two viral oncoproteins, E6 and E7. Studies have shown that E6 and E7 can directly bind to multiple host proteins as p53 and pRb, further contributing to genetic instability. The most common high risk-HPV associated with upper aero-digestive tract cancer is HPV-16. High risk-HPV positivity is associated with decreased expression of the p53 and Rb genes, overexpression of p16, decreased expression of EGFR, and a different genetic expression pattern compared with patients with high risk-HPV negative UADTC, leading to the conclusion that this is a distinct clinical entity. In addition to the etiological differences, HPV positive cancers are clinically distinct when compared with HPV-negative cancers with regard to treatment response and survival outcome, with tumor HPV positivity being a favorable prognostic biomarker.

Key words: Upper aero-digestive tract cancer; human papillomavirus; treatment; prognosis; etiology.

Correspondencia:

Dra. Claudia M. García-Cuellar

Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología,

Sau Fernando No. 22, Tlalpaui, 14080 México DF, México. Tel. (+52-55) 5628-0462; Fax: (+52-55) 5628-0432

e-Mail: claudia.garciac@salud.gob.mx

Resumen

EL CÁNCER DE LA VÍAS AERODIGESTIVAS superiores (CVADS) representa la sexta malignidad más común, con una incidencia anual aproximada de 400.000 personas en el mundo. Aunque los principales factores de riesgo para el CVADS siguen siendo la exposición al tabaco y alcohol, el virus del papiloma humano (VPH) recientemente se ha encontrado asociado en la etiología del 20 al 25 % de los CVADS, principalmente los ubicados en la bucofaringe. En humanos el VPH es causa de cáncer por expresar dos oncoproteínas virales: E6 y E7. Los estudios han demostrado que E6 y E7 se unen directamente a varias proteínas del hospedero, como p53 y pRb, para contribuir a la inestabilidad genética. El tipo de VPH de alto riesgo más asociado con cáncer de las vías aerodigestivas superiores es VPH-16. La positividad a VPH de alto riesgo se asocia a una expresión disminuida de los genes p53 y pRb, la sobreexpresión de p16 y la disminución de la expresión de EGFR, y un patrón de expresión genética diferente respecto a los pacientes con CVADS negativo a VPH de alto riesgo, esto conduce a la conclusión de que se trata de una entidad clínica distinta. Además de las diferencias etiológicas, los cánceres VPH-positivos son clínicamente diferentes en comparación con los cánceres de VPH negativos en relación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia, siendo la positividad a VPH un biomarcador pronóstico favorable.

Palabras Clave: cáncer de vías aerodigestivas superiores, Virus del papiloma humano, tratamiento, pronóstico, etiología

Introducción

El cáncer escamoso de las vías aerodigestivas superiores (CE-VADS) (con frecuencia denominado en forma imprecisa, cáncer de cabeza y cuello), representa 2 a 3% de las malignidades diagnosticadas en nuestro país (1). Aunque es relativamente raro, se trata de una entidad importante, ya que su pronóstico es malo y las secuelas del tratamiento suelen ser devastadoras. Hasta 60% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas (ECIII y IV) y el pronóstico de supervivencia oscila entre 10 y 40% a 5 años, dependiendo el sitio específico y su resecabilidad (2). En tanto que el tratamiento en etapas avanzadas está compuesto de combinaciones de cirugía, radioterapia y quimioterapia, esta combinación de tratamientos con frecuencia produce pérdidas funcionales severas y significativo deterioro estético.

Dentro del CE-VADS, el cáncer bucal y bucofaringeo (CByBF) representan un grupo importante, ya que dan cuenta del 50% de las malignidades de esta región (que también incluye a la laringe, hipofaringe, fosas nasales, senos paranasales y el esófago cervical). Con frecuencia, estas neoplasias son estudiadas en conjunto, ya que existe la noción de que comparten aspectos etiológicos, fisiopatológicos, abordajes diagnósticos y principios de tratamiento, aunque evidencia reciente sugiere que esto podría no ser del todo cierto.

Específicamente, la mayoría de los cánceres bucales se desarrollan en la lengua móvil (dos tercios anteriores de la lengua) y el piso de la boca, mientras que en la bucofaringe son más comunes en la base de lengua (el tercio posterior de la lengua) y la fosa amigdalina. Aunque en la fosa amigdalina aumenta la proporción de linfomas, en conjunto, un 90% de los tumores son carcinomas de células escamosas.

Como ya mencionamos, los cánceres de la cavidad bucal y la bucofaringe han sido asociados a los mismos factores de riesgo y etiológicos, principalmente los derivados de la exposición al tabaco y el alcohol, sin embargo, existe evidencia que sugiere que el virus

del papiloma humano (VPH) juega un importante papel en la patogénesis del carcinoma escamoso de la cavidad bucal, y en especial de la bucofaringe, con independencia de la participación del tabaco, el alcohol o ambos (3, 4). Aún más, podrían existir dos perfiles de pacientes con sus respectivas enfermedades, aquellos asociados a la infección del VPH y los relacionados a la exposición al tabaco y alcohol. Los primeros tendrían una mejor respuesta al tratamiento y mejor pronóstico. Si esto se corrobora, tendría profundas implicaciones en la forma que se evalúa a los pacientes, se analizan los riesgos y beneficios para tomar decisiones terapéuticas, y en la interpretación de los resultados de los ensayos clínicos.

El objetivo de esta revisión es presentar la información disponible en relación a la participación del VPH en la génesis del CByBF y presentar un panorama de las líneas de investigación relacionadas a las implicaciones terapéuticas.

Biología de Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) forma parte de la familia de los Papillomaviridae. Es un virus epiteliotrópico que puede inducir lesiones hiperplásicas, papilomatosas y verrucosas en el epitelio escamoso estratificado de la piel y las mucosas (5, 6).

Los VPH poseen una sola molécula de DNA de doble cadena, formada por 8,000 pares de bases aproximadamente (7), que mide unos 50 nm de diámetro. Se ha reportado la existencia de más de 120 tipos diferentes de VPH, sin embargo, solo se ha secuenciado el genoma completo de unos 100 tipos (8, 9).

La organización genética de todos los VPH es similar, formada por tres grandes regiones, una región temprana en la que se encuentran los genes responsables de la transcripción, replicación y transformación, conocidos como genes E (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8), una región tardía, que codifica dos proteínas de la cápside, L1 mayor y L2 menor, y finalmente

una región larga de control, que contiene elementos de regulación para la transcripción y replicación viral (8). Es importante señalar que la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de DNA, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional (7) (Figura 1).

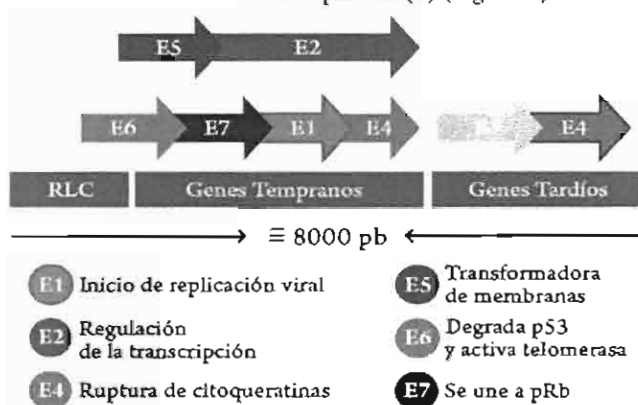


Figura 1 • Genoma del VPH.

Infección del VPH y Transformación Maligna

La transmisión de los VPH es diversa: puede ocurrir en el periodo perinatal (10), y más adelante en la vida, por contacto sexual (11) y auto inoculación, (12) aunque algunos autores sugieren además, una posible transmisión por saliva (13). La infección puede adquirirse en diferentes etapas tempranas de la vida, ya que se ha demostrado la presencia de este virus en 6% de la población infantil, 13% de los adolescentes y en el 23% de la población adulta (12).

Cada tipo de VPH se encuentra asociado con el desarrollo de lesiones específicas que se localizan en sitios anatómicos definidos del epitelio escamoso cutáneo y mucoso (14). Los VPH se han clasificado en dos grandes grupos, basados en el tipo y pronóstico de la lesión que son capaces de inducir después de la infección, en virus de alto y bajo riesgo (15).

El cáncer de cérvix se ha utilizado como modelo en la patogénesis de las neoplasias malignas mediadas por la infección del VPH. En el cáncer cervical el ge-

nomia del VPH con frecuencia se encuentra, aunque no exclusivamente, integrado en el genoma de la célula huésped (16). La integración del genoma viral al DNA celular, provoca el rompimiento del gen E2, dando como resultado la pérdida de control transcripcional mediado por E2, llevando a una desregulación de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Es decir, la transcripción de los oncogenes E6 y E7 inicialmente es reprimida por la proteína E2 (17, 18).

Las infecciones por VPH con alta carga viral son capaces de producir grandes cantidades de unidades de proteína E6 y E7, cuya acumulación en pacientes con sistemas inmunológicos incompetentes al bloquear la acción de p53 y RB incrementa el riesgo de transformación maligna (19).

La forma de replicación del VPH es diferente dependiendo del tipo de lesiones; en las lesiones benignas el genoma del VPH se integra de forma episomal extracromosómico (plásmido) mientras que en las lesiones malignas, como las del cérvix, el DNA viral se integra en el cromosoma del hospedero (7). Como en el cáncer cervical, en el CByBF el genoma del VPH puede encontrarse de forma episomal, integrado o de ambas formas (17, 18). Si bien, en algunos carcinomas de las VADS, principalmente los de amígdala, no se aprecia integración del DNA-VPH, pero puede detectarse la expresión de los oncogenes virales, lo cual indica que la integración del DNA-VPH no es un evento necesario para la carcinogénesis (17).

Con base en evidencia molecular y epidemiológica, en 1995 la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) reportó el efecto carcinogénico de los VPH tipo 16 y 18 en humanos (20). Por otro lado, desde 1983, Syrjanen y cols (21), observaron algunas características morfológicas e inmuno histoquímicas indicativas de infección por VPH en los carcinomas bucales de células escamosas. Con el primer reporte de detección de VPH de alto riesgo, en especial los tipos 16,31 y 33 en los CE-VADS (22), se inició la búsqueda de la asociación de este biomarcador con la presencia de CE-VADS.

Cáncer Bucal y Bucofaríngeo

En México, la información epidemiológica con relación al CByBF es escasa. Según el Registro Histopatológico de Neoplasias de México en el año 2002 se reportaron 820 casos de CB y 147 de la BF de un total de 108,064 malignidades, lo que significó casi 1% de éstas, mientras que el 75% de los casos ocurrió en la cavidad bucal y 25% en la orofaringe. La relación hombre y mujer fue de 1.4:1, en la cavidad bucal y 3.4:1, en la bucofaringe.

Estos indicadores se han mantenido constantes en los años recientes pero sin duda subestiman la verdadera incidencia debido a que no proceden de un registro con base poblacional. Aunque la tasa de mortalidad es pequeña, la letalidad es alta, ya que se estima que uno de cada dos afectados muere por la enfermedad (1).

A pesar de su relativa rareza, el CByBF en conjunto, es el cáncer más frecuente del tracto aerodigestivo superior y representan un problema clínico importante debido a que comúnmente se diagnostica en etapas avanzadas, asociándose a un pronóstico grave e importantes secuelas estéticas y funcionales. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de México, se reportó que la máxima frecuencia de CB ocurre entre los 50 y 70 años y la edad, en promedio a los 60 años, y en forma muy interesante, sin diferencias significativas entre géneros en cuanto a su frecuencia (23).

La acumulación de diversos cambios genéticos y epigenéticos asociados con el desarrollo del cáncer de VADS sugieren dos diferentes vías moleculares asociadas con la carcinogénesis, una asociada a la exposición de algunos agentes carcinogénicos presentes en el tabaco y alcohol, sin la participación de la infección por VPH, y la otra exclusivamente con la participación del VPH (24) (Figura 2).

Prevalencia del VPH en Cáncer Bucal y Bucofaríngeo

Evidencia epidemiológica sugiere un papel causal del VPH en la génesis del cáncer de VADS (4, 25, 26). La detección de VPH ha sido reportada en aproxi-

madamente 25% de los tumores de VADS (27). En cáncer bucal y bucofaringeo, se han reportado frecuencias de infección por VPH que varían del 0 al 100% (19); esta diversidad probablemente se debe a diferencias en los métodos seguidos por los diferentes estudios, entre las que destacan el número de casos incorporados, el tipo de población sujeta a estudio, el método y sitio de recolección de la muestra, la técnica de extracción de DNA, y el método molecular utilizado para la detección del DNA viral.

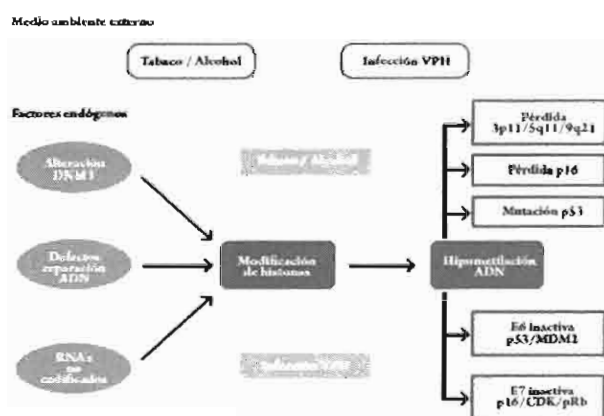


Figura 2 *
Mecanismos de alteraciones genéticas y epigenéticas del cáncer bucal y bucofaringeo.

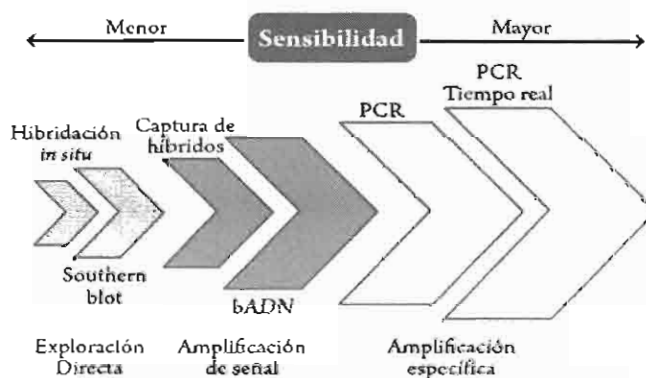


Figura 3 *
Métodos de detección del VPH en cáncer bucal y bucofaringeo.

Los métodos usados para el diagnóstico de la infección por VPH están basados principalmente en la detección del DNA viral y han sido agrupados en ensayos de alta sensibilidad (PCR, 37.1%), ensayos de moderada sensibilidad (Southern blot, 25.2%) y de baja sensibilidad (hibridación *in situ* o inmuno histoquímica, 16.9%) (28). Actualmente la técnica más utilizada para la detección de DNA-VPH es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a su alta sensibilidad, accesibilidad y bajo costo (29) (Figura 3).

Existe una asociación más vigorosa con cáncer de la bucofaringe, ya que la posibilidad de detección de VPH alcanza 50% o más (30-33). La mayor frecuencia se ha atribuido a la facilidad del acceso viral a las células basales de las criptas amigdalinas y una aparente predilección por este sitio anatómico, que sería análogo a la zona de transformación del cérvix. Un metanálisis reportó una fuerte asociación entre VPH-16 y cáncer de amígdala (RR 15.1 IC95% 6.8-33.7) (34). En contraste, los resultados de los estudios en relación a la infección por VPH en el CB muestran diferentes frecuencias pero estas parecen

ser menores (32, 35). En estudios recientes utilizando PCR varían del 4 al 71%, (25, 36). El tipo 16 el más frecuente, encontrándose en 16.5 al 90% de las muestras positivas a VPH (37, 38).

Además de lo ya mencionado, la variabilidad en las prevalencias reportadas pudiera ser el resultado de diferencias geográficas, por ejemplo, en una población africana (39), se detectó DNA-VPH en el 1% de 146 casos de CB, en Finlandia en el 30% (40), en la India en el 73% (33), y en el 76% de las encontradas en Taiwán (41). Otro factor a considerar en la variabilidad de las frecuencias es el tamaño de la muestra: el estudio que presenta el índice más alto de detección tiene un número muy reducido de pacientes (36), en el que se analizaron solo 14 muestras positivas a VPH, de las cuales 10 (71%) resultaron positivas a VPH de alto riesgo, en contraste, el reporte del 4% proviene de un estudio multicéntrico realizado en nueve países y que incluye 1,670 pacientes (25) (Cuadro 1).

En un estudio reciente, realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), se ob-

Cuadro 1 *
Prevalencias de tumores de cavidad bucal y bucofaringe positivos a VPH

Estudio	País	Método de Detección	Frecuencia	Tipo de VPH
Zeuss et al 1991 ⁷⁶	Valencia	IHQ	0%	
Lawton et al 1002 ⁷⁷	Australia	PCR	12%	16,18,31,33
Matzow et al 1998 ⁷⁸	Noruega	PCR	0%	
Miguel et al 1998 ⁷⁹	Brasil	PCR	11%	16
Schwartz et al 1998 ³⁸	USA	PCR	67%	16,18,31,33,35
Smith et al 1998 ³⁶	USA	PCR	71%	16,18,33,58
Gillison et al 2000 ²⁶	USA	PCR	25%	16,18
Shima et al 2000 ⁸⁰	Japón	PCR	73%	16,18
Mork et al 2001 ³⁵	Suecia	PCR	31%	16,18,33,73
Schwartz et al 2001 ⁸¹	USA	PCR	15%	16
Ibieta et al 2003 ⁴⁵	México	PCR	42%	16
Ritchie et al 2003 ⁸²	USA	PCR	21%	16,18,33
Dahlgren et al 2004 ⁸³	Suecia	PCR	11%	16,33,35
Kreimer et al 2005 ²⁷	Mundial*	PCR	26%	16,18,31,33,35,45,51,52,56,58
Göran et al 2005 ⁸⁴	Suecia	PCR	36%	16,33,67,68,76
Koppikar et al 2005 ⁸⁴	India	PCR	31%	16,18,38
Hammarstedt et al 2006 ³⁰	Suecia	PCR	49%	16,33,35,45
Lou et al 2007 ⁸⁶	Taiwán	PCR	21%	16,18,33,39,52,58,66,72
Pintos et al 2007 ⁸⁷	Canadá	PCR	19%	16,31,51,53,55,58
Anaya et al 2008 ⁴²	México	PCR	43%	16,18,33

servó que en el 16% de los pacientes con cáncer bucal no existía el antecedente de consumo de tabaco, alcohol, o infección por VPH, por otro lado el 53% de los casos de cáncer bucal con infección por VPH, no tenían historia de consumo de tabaco y alcohol. La prevalencia de VPH para los casos de cáncer bucal fue de 43%, siendo los tipos VPH-16 y 18 los más frecuentes (55% y 18% respectivamente) (42). Estos resultados coinciden con lo reportado por un estudio previo realizado en el INCan, donde la frecuencia de VPH asociada a CB fue del 42% (43).

El VPH como Factor de Riesgo Asociado a CByBF

Datos epidemiológicos han mostrado una diferencia entre los casos de CByBF VPH positivos y negativos. Estos estudios han demostrado que los carcinomas con VPH negativos se encuentran asociados con el consumo de tabaco y alcohol, sin embargo, un estudio reciente de casos y controles reportó la fuerte asociación de VPH con CByBF en pacientes con y sin exposición a tabaco y alcohol (4). Por otro lado, la conducta sexual también se ha reportado como un factor de riesgo importante asociado con la presencia de VPH en CByBF, siendo el comportamiento sexual y el número de parejas sexuales uno de los principales factores de riesgo (RR 3.1; IC 95% 1.5-6.5), otro aspecto de tipo sexual que representa otra probable vía importante de infección por VPH es la práctica de relaciones oro-genitales (RR 3.4 IC 95% 1.3-8.8). Estudios anteriores han demostrado una asociación entre tabaco, alcohol y conducta sexual con la presencia de CByBF (38, 44). Otro estudio reciente demostró que la conducta sexual y el uso de marihuana están asociados con la presencia CB y VPH-16 positivo, mientras que tabaco, alcohol y una deficiente higiene oral se asoció con VPH negativo (45). En un estudio de casos y controles con hombres en edad escolar, se ha descrito que el sexo oral y besar con la boca abierta, están asociados con el desarrollo de infecciones con VPH (46).

Características clínico-patológicas

Diversos estudios han reportado la presencia de tumores de cavidad oral y bucofaringe asociados a

VPH en pacientes jóvenes (40 a 60 años), en comparación con los pacientes con VPH negativo, que en promedio son 5 años mayores (>60 años) (4, 47-49). En referencia a la relación hombre: mujer, algunos estudios reportan que en tumores de VADS existe un ligero predominio en hombres (3:1) comparado con las mujeres (2, 45, 47). Un estudio reciente reportó que los pacientes con tumores de VADS positivos a VPH eran predominantemente de raza blanca y con un alto nivel educativo y económico, en comparación con los negativos a VPH (45).

Características Moleculares de la Infección por VPH

La inactivación del p53 y pRb son eventos comunes en la mayoría de los tumores en cavidad oral y la bucofaringe, sin embargo estas alteraciones ocurren por diferentes mecanismos en los tumores VPH positivos y negativos. Las alteraciones genéticas en los tumores positivos a VPH se ven reguladas por las oncoproteínas E6 y E7, que inactivan la función de p53 (50). Un estudio reciente reportó que el 57% de tumores de amígdala VPH positivos presentaban mutación en p53, en contraste con los tumores VPH negativos (57% vs 0% $p=0.008$) (51). La proteína E7 tiene la capacidad de disminuir la expresión de la ciclina D y de pRb, favoreciendo la expresión de p16 en los tumores VPH positivos de CE-VADS (50, 53).

Recientemente se ha reportado que un polimorfismo en el codón 72 de p53, modifica el riesgo de desarrollar cáncer de células escamosas en bucofaringe; y se sugiere que este polimorfismo podría ser utilizado como marcador de susceptibilidad a este tipo de cáncer, asociado a VPH 16, especialmente en pacientes no fumadores (53). Por otro lado, la expresión de p16 se ve disminuida en tumores de cabeza y cuello asociados a tabaco y alcohol, por una probable mutación, delección o metilación de este gen (54).

Con estos hallazgos se fortalece la teoría de la existencia de las dos posibles mecanismos de carcinogénesis en tumores de cabeza y cuello, por un lado los tumores de VADS VPH positivos están asociados

con un tipo silvestre de p53, una baja regulación de ciclina D y pRb y una sobreexpresión de p16, mientras que los tumores VPH negativos se caracterizan por presentar, mutaciones de p53, un incremento en la ciclina D, un normal o incrementado nivel de pRb y un decremento en la expresión de p16.

En el contexto de los eventos epigenéticos, un estudio reciente determinó el estatus de la metilación global del DNA en tumores de cavidad bucal, como evento temprano de los procesos carcinogénicos de la cavidad bucal, donde el índice de metilación del DNA fue de 4.28 (IC 95% 4.1-4.4), sin embargo, al buscar asociación de la metilación global con otras variables como tabaco, alcohol e infección por VPH los resultados no mostraron diferencia de significancia estadística (55). La regulación epigenética en la infección por VPH participa de forma trascendente en el proceso de la carcinogénesis de CB. En un estudio realizado en el INCan, se analizó el patrón de metilación del VPH-16 en cáncer de cavidad bucal, demostrando que la metilación de DNA juega un papel importante en el ciclo de vida del VPH-16, participando en el silenciamiento transcripcional de células indiferenciadas lo cual favorece su estado de latencia (56).

El VPH y Coinfección con otros Virus

Las infecciones virales han sido relacionadas con el desarrollo y propagación de diversos tipos de cáncer. Reportes epidemiológicos han demostrado que la infección por el VPH puede coexistir con otros virus, entre los cuales se encuentran el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y algunos de la familia de los herpes virus, como el VHH8 y el virus de Epstein Barr (VEB) (57, 58).

Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Recientemente se ha reportado que la infección por el VIH está fuertemente asociada con una alta prevalencia, incidencia y persistencia de la infección por VPH, así como con la persistencia y progresión de lesiones escamosas intraepiteliales (59). Estudios previos han reportado un incremento en el desarrollo de cáncer de ano, cérvix, orofaringe, pene, vagina

y vulva asociados con la infección de VPH entre pacientes con VIH/SIDA, donde el papel de la inmunosupresión aún no está bien definido (60, 61).

Un estudio reciente evaluó la asociación de diversos tipos de cáncer in situ e invasivos asociados a VPH en pacientes con infección por VIH, observándose un incremento en el riesgo de presentar lesiones malignas por la coinfección VPH/VIH. En lesiones in situ el riesgo se incrementa para cáncer de cérvix (RR= 4.6 IC 95% 4.3-5.0) y en hombres para cáncer anal (RR=60.1 IC 95% 49.2-72.2).

Por otro lado en lesiones invasivas el patrón es muy similar, afectando principalmente cérvix, pene y ano, además de afectar otros sitios, como amígdala (RR= 2.6 IC 95% 1.8-3.8), estos resultados pueden ser atribuidos a la gradual pérdida de control de los queratinocitos que se encuentran infectados por el VPH debida a una avanzada inmunosupresión por la infección del VIH (62). Si bien se han reportado controversias entre la presencia de cáncer de VADS y la infección por VPH en pacientes VIH+ (63), un estudio reciente describió la asociación de cáncer de la bucofaringe con la presencia de infección por VPH en pacientes con VIH/SIDA; el riesgo de presentar este tipo de neoplasia se vio incrementado por la coexistencia de algunos factores de riesgo, como el consumo de tabaco y la inmunosupresión atribuida a los pacientes VIH+ (64).

Virus Epstein Barr (VEB). La infección del virus de VEB ha sido reportada en coexistencia con el VPH en algunos tipos de cáncer, como el adenocarcinoma de pulmón (65) y cáncer de cérvix, aunque se ha documentado que el VEB no es un agente comensal que frecuentemente se encuentre en las lesiones malignas de cérvix (66). Un estudio reciente reportó la coinfección de VPH y VEB en 17% de lesiones intraepiteliales de alto grado (67).

Algunos estudios han examinado la asociación entre los VPH de alto riesgo y el VEB con la progresión de tumores de VADS, particularmente con los carcinomas de nasofaringe (68). Un estudio reportó la presencia de

VPH tipo 6, 11,16 en papilomas sinonasales donde el VEB juega un papel importante en su patogénesis (69).

Pronóstico y tratamiento

Un metanálisis reciente reportó el impacto en la supervivencia de los tumores de vías aerodigestivas superiores con infección por VPH, demostrando que los pacientes positivos para VPH tenían un bajo riesgo de muerte (meta RR 0.85 IC 95% 0.7-1.0), así como un bajo riesgo de recurrencia (Meta RR 0.62 IC95% 0.5-0.8) en comparación con pacientes con CByBF negativos a VPH (70).

Datos sobre un estudio prospectivo en fase 2, confirman que la infección por VPH predice una mejor respuesta a tratamiento con quimioterapia y radioterapia. El estatus de VPH en tumores de orofaringe fue estadísticamente significativo en relación con la respuesta a la terapia de inducción (82% contra 55%), por otro lado, la supervivencia mejoró cuando fue evaluada a los 2 años (95% contra 62%) y el riesgo de progresión de la enfermedad fue 72% más bajo de lo observado en los pacientes con VPH negativo (47).

La evaluación de la respuesta a la terapia, en otro estudio en pacientes con cáncer de bucofaringe, se encontró que la presencia de VPH-16 se asoció a una mejor respuesta a la quimioterapia ($p=0.001$) y a la terapia combinada de quimioterapia con radioterapia ($p=0.0005$), así como una mejor supervivencia ($p=0.007$) (71). En un estudio de 100 pacientes con cáncer de bucofaringe y co-expresión de VPH/p16, se demostró que presentaban una mejor supervivencia en comparación con aquellos pacientes con tumores VPH negativos, o positivos pero que no expresaban p16 (72), lo cual revalida la correlación existente entre la expresión de VPH y p16 (73). Estos resultados confirman que el estatus de VPH es un buen biomarcador pronóstico en tumores de cabeza y cuello. Si esto se corrobora, tendría profundas implicaciones en la forma que se evalúa a los pacientes, se analizan los riesgos y beneficios para tomar decisiones terapéuticas, y se interpretan los resultados de los ensayos clínicos.

Con el desarrollo de las vacunas contra el VPH se espera cambiar el panorama epidemiológico de estas infecciones, si bien estas vacunas no son terapéuticas si tienen un enfoque preventivo. Una de ellas es tetravalente, específica para los VPH tipo 6, 11,16 y 18, que previene principalmente las lesiones asociadas al contacto sexual, especialmente los papilomas y las neoplasias malignas.

Aun no se ha demostrado un efecto positivo en la aplicación de estas vacunas en las neoplasias de las VADS, sin embargo, considerando que las vacunas son capaces de neutralizar los viriones del VPH en los tejidos del huésped, se postula que podría existir cierta protección para el desarrollo de aquellas lesiones de cavidad bucal asociadas a los tipos 16 y 18, no obstante estos resultados solo se apreciarían en estudios a largo plazo (74, 75).

Referencia

1. DGE-RHNM. Compendio del Registro Histopatológico de las neoplasias en México Mortalidad y Morbilidad. 2002.
2. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007; 357:1695-1704.
3. Andrews F, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol.* 2009; 45: 486-491.
4. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007; 356: 1944-1956.
5. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2004; 124: 520-526.
6. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCC-CN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000; 36: 256-263.
7. Garcia-Carranca A, Gariglio PV. [Molecular aspects of human papillomaviruses and their relation to uterine cervix cancer]. *Rev Invest Clin.* 1993; 45: 85-92.
8. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1. S1-6.
9. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU,

- Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004, 324: 17-27 •
10. Tanti P, Zapparore R, Migliora P, Spinillo A, Belloni C, Carnevali L. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol*. 1999, 93: 475-479 •
 11. Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology*. 2002, 38: 227-234 •
 12. Summersgill KE, Smith ME, Levy BT, Allen JM, Haugen TT, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 62-69 •
 13. Gutman LT, Herman ME, Phelps WC. Transmission of human genital papillomavirus disease: comparison of data from adults and children. *Pediatrics* 199, 91:31-38 •
 14. Hazard K, Andersson K, Dillner J, Forslund O. Human papillomavirus subtypes are not uncommon. *Virology*. 2007, 362: 6-9 •
 15. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003, 348: 518-527 •
 16. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004, 64: 3878-3884 •
 17. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 2002, 102: 152-158 •
 18. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*. 1995, 69: 2989-2997 •
 19. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004, 15: 188-196 •
 20. IARC. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1995, 64: 1-378 •
 21. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983, 12: 418-424 •
 22. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*. 1985, 36: 575-578 •
 23. Frías M, Zeichner G, Suchil L. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Cancerología*. 1997, 43: 80-85 •
 24. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, Meijer GA, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene*. 2006, 25: 2558-2564 •
 25. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*. 2003, 95: 1772-1783 •
 26. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Vigliani M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000, 92: 709-720 •
 27. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005, 14: 467-475 •
 28. Miller CS, White DK. 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*. 1996, 82: 57-68 •
 29. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn YL. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005, 32 Suppl 1: S43-S51 •
 30. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 2006, 119: 2620-2623 •
 31. Venuti A, Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Rahimi S, Vigili M. Presence of HPV in head and neck tumours: high prevalence in tonsillar localization. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004, 23: 561-566 •
 32. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungebuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*. 2001, 92: 2875-2884 •
 33. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of

- Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*. 1997, 79: 595-604 •
34. Hobbbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2006, 31: 259-266 •
35. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001, 344: 1125-1131 •
36. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*. 1998, 108: 1098-1103 •
37. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol*. 1999, 11: 191-199 •
38. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1998, 90: 1626-1636 •
39. Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Van Heerden WF, Raubennheimer EJ, Schoub BD. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas from an African population sample. *Anticancer Res*. 1996, 16: 969-973 •
40. Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, Karja J, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res*. 1990, 282: 493-497 •
41. Chang KW, Chang CS, Lai KS, Chou MJ, Choo KB. High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan. *J Med Virol*. 1989, 28: 57-61 •
42. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, Garcia-Carranca A. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res*. 2008, 39: 189-197 •
43. Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruiz-Godoy L, Mohar A. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005, 99: 311-315 •
44. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004, 108: 766-772 •
45. Gillison ML, D'Souza C, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008, 100: 407-420 •
46. D'Souza C, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*. 2009, 199: 1263-1269 •
47. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008, 100: 261-269 •
48. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004, 96: 449-455 •
49. Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res*. 2002, 8: 1093-1100 •
50. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002, 21: 1510-1517 •
51. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008, 14: 366-369 •
52. Haffkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot EJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, Hopman AH, Manni JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and over expression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer*. 2003, 107: 394-400 •
53. Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, Adler-Storthz K, Dahlstrom KR, Schiller JT, Wei Q, Li G. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. *Carcinogenesis*. 2008, 29: 875-879 •
54. Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB, Yarbrough WG. Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. *Oncogene*. 1997, 14: 811-818 •
55. Guerrero-Preston R, Baez A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M. Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *PR Health Sci J*. 2009, 28: 24-29 •
56. Balderas-Loeza A, Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador VA, Guido-Jimenez MC, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Bernard HU, Garcia-Carranca A. Human

- papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2007, 120: 2165-2169 •
57. Lawson JS. Do viruses cause breast cancer? *Methods Mol Biol*. 2009, 471: 421-438 •
58. Ragin C, Edwards R, Heron DE, Kuo J, Wentzel E, Gollin SM, Taioli E. Prevalence of cancer-associated viral infections in healthy afro-Caribbean populations: a review of the literature. *Cancer Invest*. 2008, 26: 936-947 •
59. De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev*. 2008, 17: 545-554 •
60. Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst*. 2009, 101: 1120-1130 •
61. Palefsky JM. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Oncol*. 2003, 15: 382-388 •
62. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2000, 92: 1500-1510 •
63. Moyano S, Ordi J, Caballero M, Garcia F, Diaz A, de Sarjose S, Cardesa A, Alos L. Laryngeal squamous cell carcinoma in HIV-positive patients: lack of association with human papillomavirus infection. *HIV Med*. 2009, 10: 634-639 •
64. Gillison ML. Oropharyngeal cancer: a potential consequence of concomitant HPV and HIV infection. *Curr Opin Oncol*. 2009, 21: 439-444 •
65. Lim WT, Chuah KL, Leong SS, Tan EH, Toh CK. Assessment of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2009, 21: 971-975 •
66. Santos NB, Villanova FE, Andrade PM, Ribalta J, Iocchi J, Otsuka AY, Dale Silva I. Epstein-Barr virus detection in invasive and pre-invasive lesions of the uterine cervix. *Oncol Rep*. 2009, 21: 403-405 •
67. Lattario F, Furtado YL, Fonseca R, Silveira FA, do Val IC, Almeida G, Carvalho MG. Analysis of human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection and aberrant death-associated protein kinase methylation in high-grade squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008, 18: 785-789 •
68. Al Moustafa AE, Chen D, Chabreau L, Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses*. 2009, 73: 184-186 •
69. Gaffey MJ, Frierson HF, Weiss LM, Barber CM, Barber GB, Stoler MH. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in sinonasal Schneiderian papillomas. An in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Clin Pathol*. 1996, 106: 475-482 •
70. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007, 121: 1813-1820 •
71. Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, Urba SG, Eisbruch A, Teknos TN, Chepeha DB, Prince ME, Tsien CI, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Mason HL, Miller TH, Wallace NL, Bradford CR, Carey TE. Chemo selection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol*. 2008, 26: 3138-3146 •
72. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006, 24: 736-747 •
73. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JM, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bauer JA, Bradford CR, Carey TE. 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*. 2008, 26: 3128-3137 •
74. Harper DM. Prevention of human papillomavirus infections and associated diseases by vaccination: a new hope for global public health. *Public Health Genomics*. 2009, 12: 319-330 •
75. Koutsky L. The epidemiology behind the HPV vaccine discovery. *Ann Epidemiol*. 2009, 19: 239-244 •
76. Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991, 71: 714-720 •
77. Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med*. 1992, 21: 265-269 •
78. Matzow T, Boysen M, Kalantari M, Johansson B, Hagmar B. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol*. 1998, 37: 73-76 •
79. Miguez RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg*. 1998, 176: 428-429 •
80. Shima K, Kobayashi I, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000, 38: 445-450 •