



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Toxicología**

## **Evaluación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Toxicólogo

### **AUTOR**

**Raúl ALATRISTA CASARIEGO**

### **ASESOR**

**Mg. Carlos CASTAÑEDA ALTAMIRANO**

**Miluska CASTILLO GARCÍA (Coasesor)**

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

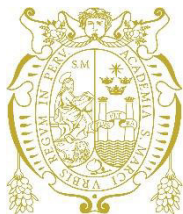
Alatrística R. Evaluación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Toxicología; 2021.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos del autor</b>	
Nombres y apellidos	Raúl Alatrística Casariego
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47687600
URL de ORCID	-
<b>Datos de asesor I</b>	
Nombres y apellidos	Mg. Castañeda Altamirano, Carlos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09873222
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-6200-0856">https://orcid.org/0000-0001-6200-0856</a>
<b>Datos de asesor II</b>	
Nombres y apellidos	Tox. Castillo García, Miluska
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46652172
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-0111-3176">https://orcid.org/0000-0002-0111-3176</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Jesús Victor Lizano Gutiérrez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09148490
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40957382
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	José Antonio Llahuilla Quea
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09780810
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	20904674

<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.2.5.1. Bases moleculares de enfermedades multifactorial y emergentes
Grupo de investigación	-
Agencia de financiamiento	FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Latitud: -12.112639 Longitud: -76.999649
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
URL de disciplinas OCDE	Toxicología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07</a>  Oncología <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.21">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.21</a>  Epidemiología <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.09">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.09</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**Evaluación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

Que presenta el Bachiller en Toxicología:

**RAÚL ALATRISTA CASARIEGO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Dieciocho (18)

-----  
en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Toxicología y Título Profesional de Toxicólogo (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**JURADO EVALUADOR (R.D. N.º 000473-2020-D-FFB/UNMSM)**

- Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez
- Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
- Dr. José Antonio Llahuilla Quea
- Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar

Lima, 10 de junio de 2021.



Firmado digitalmente por LIZANO  
GUTIERREZ Jesus Victor FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 21.06.2021 22:36:55 -05:00

**Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez**  
**Presidente**

*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE TOXICOLOGIA

### INFORME DE EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD

1	Facultad	<b>FARMACIA Y BIOQUÍMICA</b>
2	Escuela Profesional	<b>TOXICOLOGÍA</b>
3	Autoridad que emite el informe de originalidad	<b>Director de la Escuela Profesional</b>
4	Apellidos y nombres de la autoridad académica	<b>Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez</b>
5	Operador del programa informático de similitudes	<b>Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez</b>
6	Documento evaluado	<b>Evaluación del nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.</b>
7	Autor(es) del documento	<b>Bachiller : Raúl Alatrística Casariego</b>
8	Fecha de recepción del documento	<b>18/03/2021</b>
9	Fecha de aplicación del programa informático de similitudes	<b>18/03/2021</b>
10	Software utilizado	<b>Turnitin</b>
11	Configuración del programa detector de similitudes	<b>Excluye:</b> - <b>Textos entrecomillados</b> - <b>Bibliografía</b> - <b>Cadenas menores de 40 palabras</b>
12	Porcentaje de similitud según programa detector de similitudes	<b>3 % (El % de similitud debe ser <math>\leq</math> 10%)</b>
13	Observaciones	<b>2da observación</b>
14	Calificación de Originalidad	<b>Documento cumple criterios de originalidad, con observaciones</b>

Lima, 19 de Marzo del 2021



Firmado digitalmente por LIZANO  
GUTIERREZ, Jesus Victor FAU  
20143092262 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 07.04.2021 00:52:52 -05:00

**Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez**  
Director E.P. Toxicología

## **DEDICATORIA**

A Esther, mi madre. A Luisa, mi hermana. Gracias por el apoyo inconmensurable. Son los cimientos de lo que soy. Sin ellas, nada.

A mi familia Casariego por el apoyo incondicional.

A Daniela: “Si vienes, por ejemplo, a las cuatro de la tarde, comenzaré a ser feliz desde las tres. Cuanto más avance la hora, más feliz me sentiré. A las cuatro me sentiré agitado e inquieto; ¡descubriré el precio de la felicidad!”

A Grego: “No era más que un zorro semejante a cien mil otros, pero yo lo hice mi amigo y ahora es único en el mundo.”



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi alma mater la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarme los conocimientos necesarios para mi formación académica y personal.

A mis asesores de tesis el Dr. Carlos Castañeda Altamirano y a la Tox. Miluska Castillo García por orientarme durante el desarrollo de este trabajo de tesis, y por brindarme los lineamientos necesarios para conocer el mundo de la investigación.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
I.1.	Planteamiento y formulación del problema .....	1
I.1.1	Planteamiento del problema .....	1
I.1.2	Formulación del problema .....	2
I.2.	Objetivos .....	2
I.2.1	Objetivo general.....	2
I.2.2	Objetivo específico.....	2
I.3	Importancia y alcance de la investigación.....	3
I.4.	Limitaciones de la investigación.....	3
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	4
II.1.	Marco teórico .....	4
II.2.	Antecedentes del estudio.....	5
II.3.	Bases teóricas.....	10
II.3.1	Cáncer .....	10
II.3.2	Epidemiología del cáncer cabeza y cuello .....	11
II.3.3	Anatomía de cabeza y cuello.....	13
II.3.4	Carcinogénesis .....	16
II.3.5	Agentes infecciosos .....	19
II.3.6	Sistema inmune y cáncer.....	19
II.3.7	Infiltrado linfocitario tumoral (TIL).....	21
II.3.8	Relación TIL – cáncer orofaríngeo.....	22
II.3.9	Factores pronósticos.....	23
II.3.10	Supervivencia .....	23
II.4.	Glosario de términos .....	24
III.	HIPOTESIS Y VARIABLES .....	26
III.1.	Hipótesis .....	26
III.2.	Variables .....	26
III.3.	Operacionalización de variables .....	26
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
IV.1.	Área de estudio.....	27
IV.2.	Diseño de investigación.....	27
IV.3.	Población y muestra .....	27
IV.4.	Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información .....	27

IV.4.1 Selección de muestras biológicas y elaboración de los TMA .....	27
IV.4.2. Evaluación de P16 por inmunohistoquímica.....	33
IV.4.3 Evaluación del infiltrado linfocitario tumoral.....	35
IV.5. Análisis estadístico .....	35
V. RESULTADOS .....	36
V.1 Características clínicas.....	36
V.2 Características patológicas.....	37
V.3 Biomarcadores.....	39
V.4 Sobrevida global a los 3 años.....	41
V.5 Sobrevida global en relación con el P16.....	42
V.6 Sobrevida global con relación al TIL.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	48
VIII. RECOMENDACIONES .....	49
IX. FINANCIAMIENTO.....	49
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA .....	50
XI. ANEXOS .....	54

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características clínicas de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019 .....	36
<b>Tabla 2.</b> Características patológicas de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019 .....	38
<b>Tabla 3.</b> Estado del infiltrado linfocitario y P16 de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019 .....	39
<b>Tabla 4.</b> Ubicación de la neoplasia en pacientes con VPH (+) .....	39
<b>Tabla 5.</b> Nivel de infiltrado linfocitario tumoral y presencia de VPH .....	40
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de sobrevida global de los pacientes .....	41
<b>Tabla 7.</b> Relación de la sobrevida de los pacientes y P16 .....	42
<b>Tabla 8.</b> Relación de la sobrevida de los pacientes y TIL .....	43
<b>Tabla 9.</b> Presencia de VPH y TIL con relación a la supervivencia .....	44

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de casos prevalentes (5 años) como proporción en 2018, de labio, cavidad oral, ambos sexos y todas las edades .....	13
<b>Figura 2.</b> Anatomía de cabeza y cuello .....	14
<b>Figura 3.</b> Anatomía de la cavidad oral .....	14
<b>Figura 4.</b> Anatomía de la orofaringe .....	15
<b>Figura 5.</b> Diagrama del mecanismo de carcinogénesis celular .....	17
<b>Figura 6.</b> Carcinogénesis del VPH .....	18
<b>Figura 7.</b> Células del sistema inmune presentes en tumores .....	21
<b>Figura 8.</b> Selección de las muestras parafinadas .....	28
<b>Figura 9.</b> Selección de zonas en láminas de HE .....	28
<b>Figura 10.</b> Registro de orden y posición de las muestras en los TMA .....	29
<b>Figura 11.</b> Proceso de formación de bloques para TMA .....	30
<b>Figura 12.</b> Materiales y elaboración de un TMA .....	31
<b>Figura 13.</b> Proceso de corte y montaje en láminas cargadas del TMA .....	32
<b>Figura 14:</b> Representación esquemática de la técnica de inmunohistoquímica HRP de Dako System .....	34
<b>Figura 15: A.</b> Tejido con p16 negativo. <b>B.</b> Tejido con p16 positivo .....	34
<b>Figura 16.</b> Microscopio Olympus .....	35
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de pacientes VPH +/- de acuerdo con su TIL .....	40
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de sobrevida de acuerdo con los años .....	41
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de sobrevida en relación con el P16 .....	42
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de sobrevida en relación con el TIL .....	43

## **INDICES DE ANEXOS**

- Aprobación de Comité Revisor de Protocolos del INEN
  
- Herramientas utilizadas para recolección de datos
  - a.- Formato de solicitud de historias clínicas (HC)
  
  - b.- Formato de solicitud de tacos parafinados.

## **ABREVIATURAS**

<b>ADN:</b>	Acido desoxirribonucleico.
<b>SG:</b>	Sobrevida global.
<b>VPH:</b>	Virus del papiloma humano.
<b>CCyC:</b>	Cáncer de cabeza y cuello.
<b>TIL:</b>	Infiltrado linfocitario tumoral.
<b>CCE:</b>	Carcinoma de células escamosas.
<b>ILV:</b>	Invasión linfovascular.
<b>IPN:</b>	Invasión perineural.
<b>P16:</b>	Proteína 16.
<b>IARC:</b>	International Agency for Research on Cancer.
<b>SCCHN:</b>	Cáncer de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
<b>CTL:</b>	Los linfocitos T maduros citotóxicos.
<b>TMA:</b>	Microarreglos de tejidos.
<b>pH:</b>	Potencial de hidrogeno.
<b>QT:</b>	Quimioterapia.
<b>RT:</b>	Radioterapia.
<b>Th:</b>	Linfocitos T helper.
<b>Tregs:</b>	Linfocitos T reguladores.
<b>HE:</b>	Hematoxilina-Eosina.

## RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es la causa principal del cáncer de orofaringe y cavidad oral, la incidencia de estos tipos de cánceres asociados al VPH ha aumentado significativamente en los últimos años. Múltiples estudios han reportado el rol del infiltrado linfocitario tumoral (TIL) como biomarcador pronóstico de sobrevida en diferentes neoplasias, incluidos tumores de cabeza y cuello.

En este estudio se analizó retrospectivamente 122 muestras de pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas para determinar las características clínicas y patológicas asociadas a la mortalidad de la enfermedad. Se determinó la presencia del virus mediante la prueba de inmunohistoquímica de proteína 16 (P16). Se evaluó el nivel de TIL y se clasificó en TIL bajo (<20) y TIL alto (>20) para la determinación del estatus inmunológico de los pacientes. Se utilizó la regresión de Cox para poder examinar las asociaciones entre los factores que afectan a la supervivencia de los pacientes de la población del estudio.

Los resultados mostraron una prevalencia del VPH de 6,5% y el sitio de la neoplasia con mayor frecuencia fue de lengua (94.26%). El 56,6% de la población de estudio tuvo una supervivencia global (SG) de 3 años. Se concluyó que los biomarcadores de P16 y TIL no se asociaron con una mejor supervivencia en la población estudiada. Se recomienda realizar estudios relacionados al tema con una mayor cantidad de población y analizar de manera más específica mediante pruebas moleculares los diferentes subtipos del VPH.

**Palabras claves:** Cáncer de cabeza y cuello, VPH, proteína 16, TIL, sobrevida.



## **ABSTRACT**

The human papillomavirus (HPV) is the main cause of oral cavity and oropharyngeal cancer, the incidence of these types of HPV-associated cancers has increased significantly in recent years. Multiple studies have reported the role of the tumor infiltrate lymphocytic (TIL) as a prognostic biomarker for survival in different neoplasms, including head and neck tumors.

In this study, 122 samples of patients with head and neck cancer treated at the National Institute of Neoplastic Diseases were retrospectively analyzed to determine the clinical and pathological characteristics associated with the mortality of the disease. The presence of the virus was determined by the protein 16 (P16) immunohistochemical test. The level of TIL was evaluated and classified into low TIL (<20) and high TIL (> 20) to determine the immunological status of the patients. Cox regression was used to examine the associations between factors that affect survival of patients in the study population.

The results showed a prevalence of HPV of 6.5% and the most frequent site of the neoplasia was the tongue (94.26%). The study population had a 3-year overall survival (OS) of 56.6%. It was concluded that the P16 and TIL biomarkers did not show a relationship with better survival in the population studied. It is recommended to carry out studies related to the subject with a larger number of the population and to analyze the different HPV subtypes in a more specific way using molecular tests.

**Keywords:** Head and neck cancer, HPV, protein 16, TIL, survival.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. Planteamiento y formulación del problema**

### **I.1.1 Planteamiento del problema**

La evidencia molecular sustancial sugiere un papel carcinogénico para el virus del papiloma humano en la patogénesis del carcinoma de células escamosas de los cánceres de cabeza y cuello, pero los datos epidemiológicos son inconsistentes. La infección con los tipos de virus del papiloma humano, VPH, que causan cáncer, especialmente el tipo oncogénico 16, es un factor de riesgo para algunos tipos de los cánceres de cabeza y cuello, en particular los cánceres de cavidad oral y orofaringe que implican las amígdalas y la base de la lengua. La evaluación del infiltrado linfocitario es un área con gran potencial de desarrollo en los últimos años, y múltiples estudios indican un alto valor pronóstico para este biomarcador, sin embargo los estudios en tumores de cabeza y cuello aún son limitados.

Según la OMS el cáncer oral ha ido en aumento, en los últimos años en América Latina se registran más de 500,000 casos nuevos cada año. No obstante, existe una variabilidad geográfica con una mayor prevalencia en América del Sur, Sudeste Asiático y sobre todo en la India, en la cual el cáncer oral representa el 40% de todos los tumores malignos. La OMS también indica que, la incidencia de cánceres de orofaringe causados por infección por VPH está aumentando, mientras que la incidencia de cánceres de orofaringe relacionados con otras causas está bajando. Existe una falta de identificación de biomarcadores que permitan elegir el mejor abordaje terapéutico para los pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

## **I.1.2 Formulación del problema**

### **Problema general:**

- ¿Cuál es el nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello?

### **Problemas específicos:**

- ¿Cuál es el nivel de infiltrado linfocitario en tumores de cáncer de cabeza y cuello?
- ¿Cuál es el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello?
- ¿Cuál es la relación de la asociación del infiltrado linfocitario y virus del papiloma humano en la sobrevida de pacientes con cáncer de cabeza y cuello?

## **I.2. Objetivos**

### **I.2.1 Objetivo general**

- Evaluar el nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

### **I.2.2 Objetivo específico**

- Evaluar el nivel de infiltrado linfocitario en tumores de cáncer de cabeza y cuello.
- Evaluar el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.
- Evaluar la relación de la asociación del infiltrado linfocitario y virus del papiloma humano en la sobrevida de pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

### **I.3 Importancia y alcance de la investigación**

Se sabe que el pronóstico de vida para los pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral y orofaringe sigue siendo pobre a pesar de los avances en el tratamiento de esta neoplasia maligna, aproximadamente del 5% al 15% de la población general puede tener una lesión en la mucosa oral. Actualmente, no existe una estrategia generalmente aceptada para identificar a estos pacientes. Uno de los agentes infecciosos de los factores de riesgo asociado al cáncer de cabeza y cuello en el Perú es el virus del papiloma humano cuya incidencia en el país representa un mayor riesgo a desarrollar el proceso de carcinogénesis. Debido a esto es importante que se realicen investigaciones con el fin de ofrecer un pronóstico asociado a la supervivencia de los pacientes. Esta investigación brindará información más precisa acerca del estado inmunitario en pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello y el rol del agente carcinogénico del VPH sobre el pronóstico de esta enfermedad. Los resultados de este estudio podrían proveer conocimiento sobre la identificación de biomarcadores pronósticos de este tipo de cáncer en la población peruana para un abordaje oportuno de la enfermedad y tratamiento adecuado.

### **I.4. Limitaciones de la investigación**

En el presente trabajo una limitación que se presentó debido a que este trabajo es un estudio con diseño de investigación retrospectivo fue los datos incompletos en las historias clínicas de los pacientes.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### II.1. Marco teórico

En los últimos 50 años la tasa global de muertes por cáncer ha aumentado, se mantiene entre los tres primeros lugares de las enfermedades con más alta mortalidad. El carcinoma de células escamosas (CCE) ocupa el 90% de todas las neoplasias malignas en la cavidad oral y la orofaringe. A nivel mundial ocupa el decimoprimer puesto entre los cánceres más comunes, con una alta incidencia en países como India, Australia, Francia, Brasil y el sur de África. Los cánceres de la cavidad oral, que incluyen la lengua, el piso de la boca, las encías, el paladar y otros sitios de la boca tienen una asociación claramente establecida con fumar o masticar tabaco y con el consumo de alcohol. Sin embargo, existe un subconjunto de cánceres que se presenta entre sujetos que no están expuestos a fumar o beber. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) concluyó que, en la cavidad oral, había pruebas suficientes de la carcinogenicidad del VPH 16, y pruebas limitadas de la carcinogenicidad del VPH 18.

El cáncer de la cavidad oral asociado al VPH se presenta comúnmente en la etapa avanzada y generalmente está poco diferenciado. Los estudios reportan una supervivencia a largo plazo significativamente mejor en la mayoría de los pacientes con VPH positivo para el VPH en comparación con aquellos con enfermedad VPH negativa. La explicación de esto sigue siendo poco clara y puede ser multifactorial. Asimismo, estudios de ensayos proporcionan una fuerte evidencia de que la presencia de VPH en los tumores es un factor pronóstico independiente para sobrevida total y sobrevida libre de enfermedad entre pacientes con carcinoma escamoso de orofaringe, lo cual es consistente con la hipótesis de que los carcinomas de orofaringe tienen diferentes causas, factores de riesgo y sobrevida en dependencia de su asociación o no al VPH. Algunos estudios plantean, basados en la evidencia molecular y epidemiológica, que los cánceres de laringe asociados al VPH son una entidad patológica distinta y tienen mejor pronóstico. Los linfocitos T ayudan a destruir las células tumorales y a controlar las respuestas inmunitarias. Linfocitos T

citotóxicos son los que atacan a células cancerosas escamosas orales. Los TIL se componen principalmente de subconjuntos de células T CD4+ y CD8+. Múltiples estudios han reportado el rol del TIL como biomarcador pronóstico de sobrevida en diferentes neoplasias.

En nuestro país la información sobre esta enfermedad es escasa y son pocos los estudios específicos que puedan proveer de datos con respecto al cáncer de cabeza y cuello y más aún con relación al VPH y nuevos biomarcadores potenciales. El objetivo de estudio fue evaluar el nivel de infiltrado linfocitario tumoral y el estatus de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

## **II.2. Antecedentes del estudio**

Ang y col. realizaron un análisis retrospectivo de la asociación entre el estado del VPH tumoral y la supervivencia en 323 pacientes con carcinoma de células escamosas orofaríngeos en estadio III o IV que se inscribieron en un ensayo aleatorio que comparó la radioterapia de fraccionamiento acelerado con la radioterapia de fraccionamiento estándar, en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. La mediana de seguimiento fue de 4,8 años. La tasa de supervivencia global a los 3 años fue similar en el grupo que recibió radioterapia de fraccionamiento acelerado y el grupo que recibió radioterapia de fraccionamiento estándar (70.3% vs. 64.3%;  $P = 0.18$ ; índice de riesgo de muerte con radioterapia de fraccionamiento acelerado, 0.90; Intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,72 a 1,13). Un total de 63,8% de los pacientes con cáncer de orofaringe tenían tumores positivos para el VPH; estos pacientes tuvieron mejores tasas de supervivencia general a los 3 años (82,4%, frente a 57,1% entre los pacientes con tumores HPV negativos;  $P < 0,001$  por la prueba de log-rank)(1).

Ward y col. analizaron retrospectivamente a 270 pacientes tratados por cáncer orofaríngeo positivo al virus del papiloma humano de tres centros hospitalarios del Reino Unido, en este estudio se examinó los efectos del estado del VPH y los niveles de TIL (infiltrado linfocitario tumoral) en la supervivencia en

pacientes con cáncer orofaríngeo. Los tumores positivos para el VPH se asociaron con una supervivencia significativamente mejorada (supervivencia a 3 años; 82% del VPH positivo frente al 56% negativo para el VPH,  $p < 0,001$ ); determinaron que los niveles de TIL predicen la supervivencia en pacientes con cáncer orofaríngeo. Los niveles altos de TIL se asocian significativamente con el estado del VPH, lo que sugiere que la razón para una mejor supervivencia en la mayoría de los casos de cáncer orofaríngeo positivos para el VPH es la presencia de una respuesta inmune antitumoral adaptativa del huésped.(2)

D'Souza y col. realizaron un estudio de casos y controles en un hospital de 100 pacientes con cáncer de orofaringe recién diagnosticado y 200 pacientes de control sin cáncer para evaluar las asociaciones entre la infección por VPH y el cáncer de orofaringe. Se encontró que un número elevado de parejas de sexo vaginal (26 o más) se asoció con cáncer orofaríngeo (IC 95%, 1,5 - 6,5), al igual que un número elevado de parejas de sexo oral durante toda la vida (6 o más). El grado de asociación aumentó con el número de parejas de sexo vaginal y oral (valores de P para la tendencia, 0,002 y 0,009, respectivamente). La seropositividad al VPH se asoció en gran medida con el cáncer de orofaringe en sujetos con un historial de consumo excesivo de tabaco y alcohol (OR, 19.4; IC 95%, 3.3 -113.9) y entre aquellos sin un historial de este tipo (OR, 33.6; 95 % IC, 13,3 - 84,8)(3).

Albers y col. realizaron un estudio en 18 pacientes con diagnóstico de cáncer de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) Estos pacientes con SCCHN orofaríngeo o laríngeo ( $n = 18$ ) fueron atendidos en las clínicas ambulatorias del Instituto de Cáncer de la Universidad de Pittsburgh. También se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ocho donantes sanos HLA-A \*0201+. Los pacientes con SCCHN incluyeron sitios de tumor primario de la siguiente manera: amígdalas ( $n = 10$ ), base de la lengua ( $n = 4$ ) y laringe ( $n = 4$ ). Se les extrajo sangre venosa periférica (30-40 ml) en tubos heparinizados y se entregó inmediatamente al laboratorio para la recuperación de linfocitos en gradientes Ficoll-Hypaque. Los autores mencionan que las proteínas oncogénicas codificadas por el VPH, como E7, son antígenos específicos de tumor promotores y son obligatorios para el crecimiento tumoral. Debido a que pocos estudios inmunológicos han analizado

la respuesta inmune específica de VPH endógena en este subconjunto de pacientes con SCCHN, optaron por estudiar las frecuencias de células T contra HPV-16 E7<sub>11-20</sub> o E7<sub>86-93</sub> en antígeno leucocitario humano (HLA) portador de tumor -A \*0201+ pacientes SCCHN, cuyos tumores fueron HPV-16+ o HPV-16-. En los pacientes con HPV-16+ SCCHN, las frecuencias de células T contra cualquiera de los péptidos fueron significativamente elevadas ( $P < 0.005$ ) en comparación con el VPH-16+ pacientes voluntarios. Los autores indican que una posible explicación del beneficio de supervivencia puede ser que los linfocitos T infiltrantes de tumores, que impregnan muchos cánceres de la cavidad oral positivos para el VPH, confieren un efecto protector a través de una respuesta inmune adaptativa dirigida contra antígenos virales y células T.(4)

Gooden y col. realizaron una revisión sistémica con metaanálisis para lo cual diseñaron una búsqueda bibliográfica en Pubmed y Embase. Se incluyeron estudios en los que se determinó la importancia pronóstica de los linfocitos intratumorales CD3+, CD4+, CD8+ y FoxP3+, así como las proporciones entre estos subconjuntos, en tumores sólidos. Se incluyeron 52 artículos en la parte de revisión sistemática del estudio. En el análisis agrupado, los CD3+ TIL tuvieron un efecto positivo en la supervivencia con una razón de riesgo (HR) de 0,58 (intervalo de confianza (IC) del 95%: 0,43-0,78) para la muerte, al igual que los CD8+ TIL con un HR de 0,71 (IC del 95%: 0,62 –0,82). Las TIL reguladoras FoxP3+ no se vincularon con la supervivencia general, con una FC de 1.19 (IC del 95%: 0.84 a 1.67). La relación CD8 / FoxP3 produjo una FC más impresionante (riesgo de muerte: HR 0,48; IC del 95%: 0,34 a 0,68), pero se utilizó en relativamente pocos estudios. Esto nos indica que, aunque la abundancia de TIL se asocia con mejores resultados clínicos en varios otros tipos de tumores, su papel en la malignidad de cabeza y cuello no está bien documentado.(5)

Brandwein y col. evaluaron la infiltración de linfocitos en más de 200 carcinomas orales de células escamosas. Mediante el análisis multivariado, estos investigadores identificaron que una respuesta linfocitaria débil o limitada en el tumor y el margen del estroma se asoció con un aumento de la recurrencia local regional y una disminución de la supervivencia general.(6)



Chaturvedi y col. determinaron el estado del VPH para los 271 cánceres de orofaringe (1984-2004) recolectados por los tres registros de cáncer basados en la población en el Programa de repositorios de tejidos residuales de vigilancia, epidemiología y resultados finales mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el genotipado, carga viral de HPV16 y expresión de ARNm de HPV16. Encontraron que la prevalencia del VPH en los cánceres de orofaringe aumentó significativamente durante el tiempo calendario, independientemente del ensayo de detección del VPH (tendencia  $P < 0,05$ ). Y La incidencia a nivel poblacional de los cánceres de orofaringe positivos al VPH aumentó en un 225% (IC del 95%, 208% a 242%) de 1988 a 2004 (de 0.8 por 100,000 a 2.6 por 100,000), y la incidencia de los cánceres negativos al VPH disminuyó en 50 % (IC 95%, 47% a 53%; de 2.0 por 100,000 a 1.0 por 100,000). Si las tendencias de incidencia recientes continúan, se espera que el número anual de cánceres de orofaringe positivos al VPH supere el número anual de cánceres cervicales para el año 2020.(7)

Gillison y col. analizaron tejidos tumorales de 253 pacientes con HNSCC recién diagnosticado o recurrente para detectar la presencia del genoma del VPH mediante el uso de ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La región de codificación viral E6 fue secuenciada para confirmar la presencia de aislados virales específicos de tumor. Los exones 5–9 del gen TP53 se secuenciaron a partir de 166 muestras. El riesgo de muerte por HNSCC en pacientes con y sin tumores VPH positivos se determinó mediante análisis de regresión de riesgos proporcionales. Se detectó VPH en 62 (25%) de 253 casos (intervalo de confianza [IC] del 95% = 19% –30%). Se identificó HPV16 de tipo tumorigénico de alto riesgo en el 90% de los tumores positivos para HPV. HPV16 fue localizado específicamente por in situ hibridación dentro de los núcleos de las células cancerosas en la enfermedad preinvasiva, invasiva y ganglionar. En comparación con los cánceres orofaríngeos negativos al VPH, los cánceres orofaríngeos positivos al VPH tenían menos probabilidades de ocurrir entre los bebedores de moderados a grandes (OR = 0,17; IC del 95% = 0,05–0,61) y los fumadores (OR = 0,16; IC del 95% = 0,02– 1.4), tenía una morfología basaloide característica (OR = 18.7; IC 95% = 2.1–167), eran menos propensos a tener mutaciones TP53 (OR =

0.06; IC 95% = 0.01–0.36), y mejoró la supervivencia específica de la enfermedad (cociente de riesgos [HR] = 0.26; IC 95% = 0.07–0.98).(8)

Sethi y col. analizaron 385 bloques de tejido HNSCC identificados a través de un registro de cáncer de base poblacional en Metropolitan Detroit para el ADN del VPH utilizando una técnica de PCR de amplio espectro para correlacionar con las características del paciente y del tumor y la supervivencia general. En general, el ADN del VPH (cualquier tipo) se detectó en el 29,4% de todos los HNSCC, pero fue significativamente más prevalente (50,6%) en los sitios orofaríngeos (N= 81), donde el 90% de los VPH eran de tipo 16, que en otros sitios. La prevalencia del VPH (cualquier tipo) en los sitios orofaríngeos fue más alta en pacientes con un indicador de tabaquismo negativo, caucásicos y en la etapa tumoral regional. Del mismo modo, solo en los sitios orofaríngeos los pacientes en general positivos al VPH mostraron una supervivencia significativamente mejor en comparación con los pacientes negativos para el VPH, especialmente entre aquellos que habían sido irradiados.(9)

Liang y col. compararon ensayos de VPH serológicos y basados en PCR, así como inmunohistoquímica p16, individualmente y en combinación en un único estudio basado en la población para evaluar sus asociaciones con la supervivencia general entre pacientes con HNSCC y, por lo tanto, su valor potencial como biomarcadores. La serología del VPH16 se determinó para 488 pacientes. La detección inmunohistoquímica de la expresión de p16 en tumores se realizó en un subconjunto de 233 casos, y métodos basados en PCR para evaluar la presencia de ADN de HPV16 en un subconjunto de 179 casos de tumores. E6 / E7 + = 0.1, intervalo de confianza (IC) del 95% = 0.02–0.3]. Ni la presencia de ADN del VPH16 ni la inmunotinción de p16 se asoció con una supervivencia global mejorada significativa en la enfermedad orofaríngea (ADN de HR = 0,9, IC del 95% = 0,3–2,9; HR p16 = 0,3, IC del 95% = 0,1–1,1). Sin embargo, la combinación de ADN positivo para el VPH y la serología E6 o E7 se asoció con una mejor supervivencia general en la enfermedad orofaríngea (HR DNA + / E6 / E7 + = 0.1, IC 95% = 0.02–1.0), mientras que los pacientes seronegativos E6 / E7 con evidencia del VPH en el ADN tumoral no mostraron ninguna evidencia de supervivencia favorable (HR DNA + / E6- / E7- = 3.4, IC 95% = 0.6–18.1). Además, los pacientes con tinción de p16 y seropositividad

E6 o E7 tuvieron una supervivencia favorable de la enfermedad orofaríngea (HR<sub>p16 + / E6 / E7 +</sub> = 0.1, IC 95% = 0.02–0.4), mientras que los pacientes que fueron positivos para p16 y seronegativos para E6 / E7 tuvieron un riesgo significativamente mayor de todas las causas de muerte (HR<sub>p16 + / E6- / E7-</sub> = 3.1, 95 % CI = 1.2–7.7). Se observó una asociación más fuerte de la presencia de VPH con el pronóstico (evaluado por la supervivencia por todas las causas) cuando se define el HNSCC "asociado al VPH" utilizando el estado del tumor (estado del ADN del VPH o P16) y la serología del VPH E6 / E7 en combinación en lugar del estado del VPH del tumor solo.(10)

Wansom y col. midieron los linfocitos CD8, CD4, CD68 y Treg (FoxP3) mediante inmunohistoquímica en un microarreglo de tejidos creado a partir de pacientes (n = 46) con cáncer de orofaringe avanzado. Determinaron las correlaciones con los niveles de sangre periférica, el estado del VPH, la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el tumor clínico y las características y resultados del paciente. La mediana de seguimiento fue de 6.6 años. Los pacientes con VPH - 16 positivos tuvieron una mejor supervivencia ( $p = 0,016$ ). El grado de infiltración de células T no difirió según el estado del VPH, pero se relacionó significativamente con la supervivencia específica de la enfermedad (DSS) y la supervivencia general (OS). Incluso después de ajustar el estado del VPH, encontraron que CD8, FoxP3 y las células T totales se asociaron significativamente con DSS ( $P = .0236$ ,  $P = .0040$  y  $P = .0197$ , respectivamente) y OS ( $P = .0137$ ,  $P = .0158$  y  $P = .0115$ , respectivamente). Menos infiltración de células T ( $P = .0130$ ) y células CD4 en particular ( $P = .0792$ ) se asociaron con una mayor expresión de EGFR.(11)

### **II.3. Bases teóricas**

#### **II.3.1 Cáncer**

Una neoplasia es aquella masa de crecimiento anormal de tejido, cuyo desarrollo excede de los tejidos normales y no está regulado con estos, y que es persistente en el mismo modo excesivo aun después de que el

estímulo que le dio origen haya finalizado. A la definición dada se le puede añadir que dicha masa anormal no tiene finalidad alguna, hace presa del huésped y es prácticamente independiente. Las neoplasias malignas o también llamadas cánceres se diferencian de su contraparte benigna en diversos sentidos, sin embargo, las características que definen a los tumores malignos son su capacidad para invadir los tejidos locales y formar metástasis a sitios distantes. Las neoplasias malignas en su mayoría suelen crecer con rapidez y cuando logran invadir el tejido circundante es difícil establecer el punto en que comienza el tejido tumoral y en el que termina el normal(12). El tumor puede parecer fijo a los tejidos subyacentes cuando se le examina, puesto que se extiende hacia los tejidos y no solo los desplaza hacia un lado. En la investigación histológica las células cancerígenas pueden hallarse muy bien diferenciadas o mostrar indiferenciación leve o intensa, y también pueden guardar escasa similitud con el tejido original. El cáncer es asintomático en sus primeras fases. Cuando los síntomas aparecen son variados y van a depender de la ubicación en que se encuentra y del tipo del tumor implicado. Existen dos diferentes tipos generales de neoplasias malignas: carcinoma y sarcoma. En la nomenclatura relacionada al cáncer el término carcinoma se emplea en los cánceres que derivan de células epiteliales, por ejemplo, carcinoma epidermoide y carcinoma baso celular. De igual manera, el término sarcoma se aplica a los tumores que derivan de tejidos conectivos y esta palabra se añade el nombre del tejido de origen específico, como fibrosarcoma y osteosarcoma o sarcoma osteogénico(13).

### **II.3.2 Epidemiología del cáncer cabeza y cuello**

La infección con los diferentes tipos de virus del papiloma humano (VPH), que ocasionan cáncer, principalmente el tipo 16, es un factor de riesgo para algunos tipos de los cánceres de cabeza y cuello, particularmente los cánceres de la cavidad oral y orofaringe que involucran las amígdalas o la base de la lengua. En América, la incidencia de cánceres de orofaringe producidos debido a la infección por VPH está aumentando, mientras que la incidencia de cánceres de orofaringe concernientes con otras causas está descendiendo(12).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer oral ha ido en crecimiento en los últimos tiempos, en América Latina se identifican más de 500,000 casos nuevos cada año. No obstante, hay una variabilidad geográfica con una mayor prevalencia en América del Sur, Sudeste Asiático y mayormente en la India, en la cual el cáncer oral llega a representar el 40% de todos los tumores malignos. Según la edad, el 90% de los cánceres orales se diagnostican entre las edades de 50 y 70 años, últimamente se ha evidenciado un mayor incremento en la incidencia de esta enfermedad en pacientes menores de 40 años; este incremento se deba probablemente también a otros factores de riesgo como el consumo tanto de tabaco como de alcohol(14).

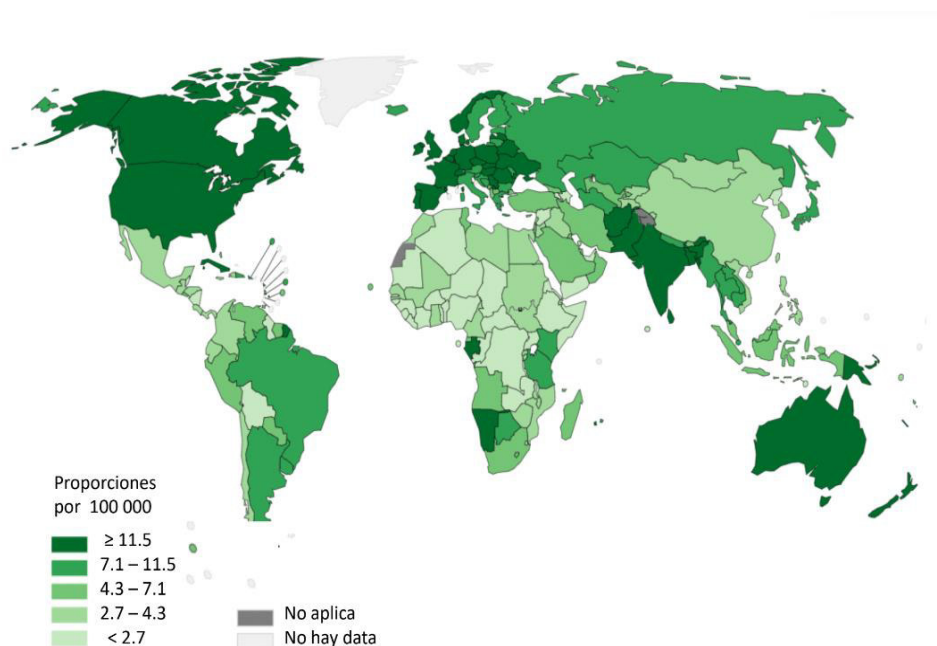
Los cánceres de cabeza y cuello representan alrededor del 4 % de todas las neoplasias en Estados Unidos. Esos cánceres son más de dos veces comunes en los hombres que en las mujeres. Los cánceres de cabeza y cuello son también diagnosticados con mayor frecuencia entre personas que tienen más de 50 años que entre personas que son más jóvenes. Investigaciones calculan que más de 65 000 hombres y mujeres en este país fueron diagnosticados con cánceres de cabeza y cuello en 2018(15).

Las personas que son diagnosticadas con cáncer de orofaringe ocasionado por VPH se les da un tratamiento diferente de las personas con cáncer de orofaringe que no es producido por VPH. Investigaciones más recientes han mostrado que pacientes con tumores de orofaringe causados por VPH tienen un mejor pronóstico de vida y pueden ponerse bien con un tratamiento no muy intenso. Diferentes estudios clínicos que están en curso investigan este tema(16).

Según el INEN el cáncer de cavidad oral en los últimos años ha ido en aumento, ubicándose en la actualidad en el puesto 11vo con mayor prevalencia en el sexo masculino(17).

De acuerdo con la "International Agency for Research on Cancer", más de 572 034 personas alrededor del mundo son diagnosticadas anualmente por cáncer de esófago, 354 864 personas por cáncer de labio y cavidad oral, 177 422 personas por cáncer de laringe, 129 079 personas por cáncer de

nasofaringe, 92 887 personas por cáncer de orofaringe, 80 608 personas con cáncer y 52 799 personas por cáncer de glándulas salivales. En América latina y el Caribe se registraron 20 975 nuevos casos de cáncer de esófago y 17 894 muertes; registraron 19 898 nuevos casos de cáncer de labio y cavidad oral y 7 874 muertes; 17 044 nuevos casos de cáncer laríngeo y 10 465 muertes; 2 682 nuevos casos de cáncer de nasofaringe y 1 240 muertes; 9 180 nuevos casos de cáncer de orofaringe y 4 703 muertes; 2 756 nuevos casos de cáncer de hipofaringe y 1 197 muertes(18).

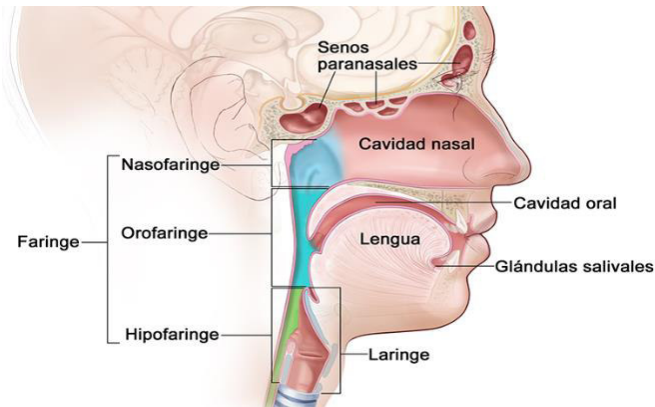


**Figura 1.** Número de casos prevalentes (5 años) como proporción en 2018, labio, cavidad oral, ambos sexos y todas las edades. Fuente: Globocan 2018.

### II.3.3 Anatomía de cabeza y cuello

El cáncer que comienza en la cabeza y el cuello puede tener muchos nombres. Depende del lugar en donde se origine. Todos estos tipos comienzan cuando células en determinadas regiones de la cabeza o del cuello comienzan a crecer de forma descontrolada y desplazan a las células normales. Esto dificulta que el cuerpo funcione de la manera en que debería hacerlo. Incluye numerosas localizaciones anatómicas con

múltiples sublocalizaciones lo que conlleva diferentes comportamientos clínicos y resultados. Representan aproximadamente el 5% de todos los cánceres.(19)

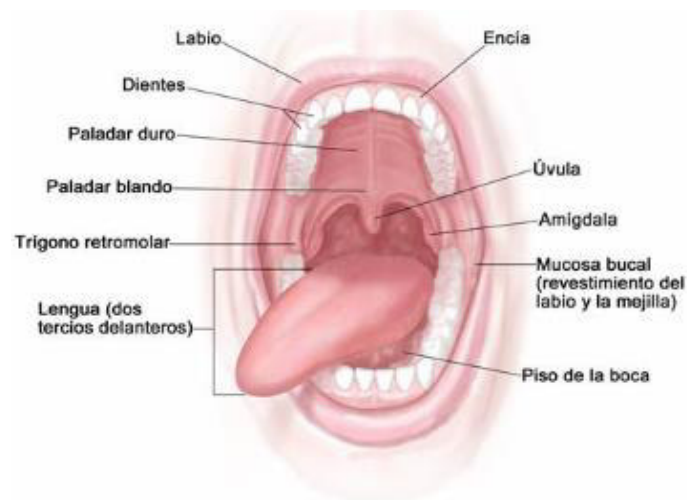


**Figura 2.** Anatomía de cabeza y cuello.

Fuente: National Institutes of Health.

**a. Cavidad oral:**

Labios, suelo de boca (debajo de la lengua), dos tercios anteriores de la lengua, trigono retromolar (el área ubicada entre las muelas del juicio), encía superior e inferior, paladar duro (la porción delantera ósea del techo de la boca) y mucosa oral (el revestimiento interno de los labios y las mejillas).



**Figura 3.** Anatomía de la cavidad oral.

Fuente: National Institutes of Health.

## **b. Faringe:**

b.1. Orofaringe.- Ubicada en la parte posterior de la cavidad oral en la que incluye el paladar blando, área tonsilar (amígdalas) la pared lateral y posterior de la garganta, base de lengua (tercio posterior) y pared posterior de la faringe.



**Figura 4.** Anatomía de la orofaringe.  
Fuente: National Institutes of Health.

b.2. Hipofaringe.- Incluye al seno piriforme, superficie posterior de la laringe y paredes inferoposterior e inferolateral de la faringe

b.3. Nasofaringe.- Se divide en 3 áreas anatómicas: laringe supraglótica, glótica (incluye las cuerdas vocales verdaderas, mucosa de la comisura anterior y posterior), y la laringe subglótica (que se extiende hasta el borde inferior del cartílago cricoides).

### **c) Cavidad nasal y senos paranasales**

Incluye el maxilar, hueso etmoides, esfenoides y senos frontales.

### **d) Glándulas salivales**

Incluye las parótidas, submandibulares y sublinguales(19).



## **II.3.4 Carcinogénesis**

### **II.3.4.1 Mecanismo de carcinogénesis**

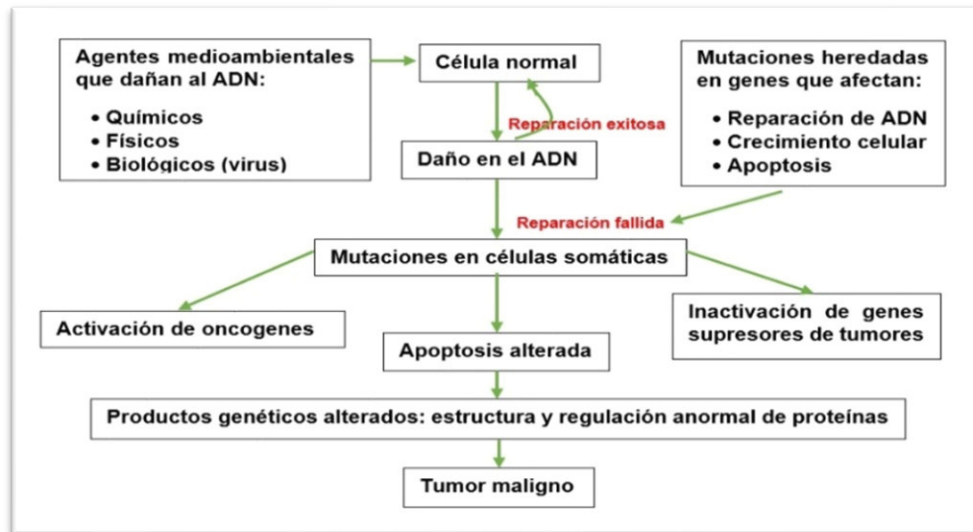
La carcinogénesis es el desarrollo o proceso de crecimiento del cáncer. El daño genético o la mutación es el fundamento de la carcinogénesis. Los protooncogenes, los genes supresores tumorales, los genes de reparación del ADN y los genes que regulan la apoptosis son necesarios para controlar el ciclo de crecimiento celular. Cualquier daño a estos genes altera el equilibrio delicado entre el crecimiento y la muerte de las células(20).

Protooncogenes: los protooncogenes mutados se convierten en oncogenes. El oncogén favorece o acelera el crecimiento de una célula específica. Las mutaciones más frecuentes de los 16 protooncogenes implican una alteración de solo uno o dos pares de bases de la cadena de ADN. Otro tipo de mutación implica la translocación de material genético de un cromosoma a otro distinto. La sobreexpresión del gen causa la síntesis de cantidades excesivas de factor de crecimiento, por lo que se forman tumores agresivos con mala evolución.

Genes supresores tumorales: estos genes inhiben el crecimiento de las células con daño en el ADN y desencadenan la reparación mediante genes de reparación del ADN o identifican las células que deben sufrir apoptosis si no pueden repararse. Existen varios genes distintos que se consideran supresores tumorales. El gen p53 es uno de los más importantes denominado el guardián del genoma. Es el blanco más frecuente de la mutación genética en los cánceres humanos.

Genes de supresión del ADN: estos genes forman una línea de defensa contra las mutaciones genéticas. Están contenidos en el material genético de todas las células, donde vigilan la integridad del ADN y regulan la reparación o destrucción de las células implicadas. Si estas funciones genéticas se pierden, las células con errores en el ADN pueden multiplicarse. Un desarrollo de este tipo (ya sea benigno o maligno) es posible si los errores comprenden un cambio neoplásico.

Genes reguladores de la apoptosis: los tumores no solo derivan de la presencia de células que son capaces de evadir la apoptosis o muerte. La mutación de los genes que regulan la apoptosis podría dar origen a la formación de células inmortales. La disminución de la muerte celular también determina la formación del tumor(21).



**Figura 5.** Diagrama del mecanismo de carcinogénesis celular.

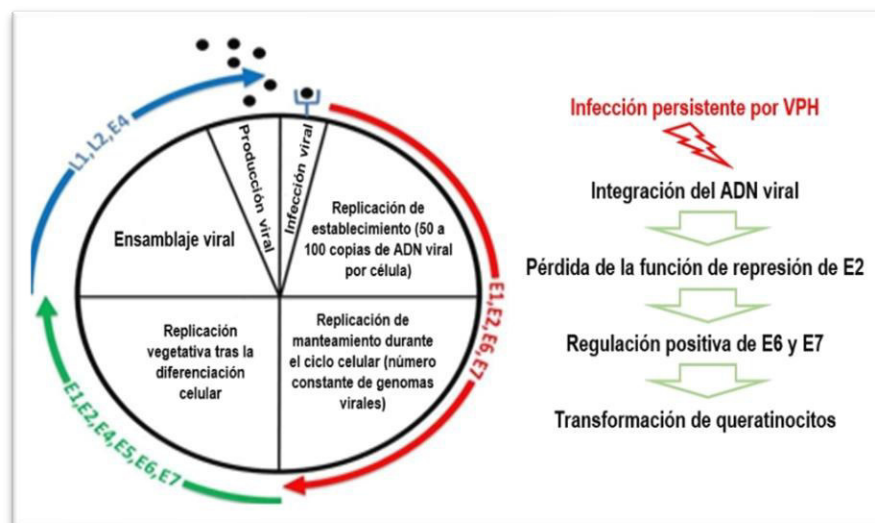
#### II.3.4.2 Carcinogénesis por VPH

Los mecanismos de la OPSCC dirigida por el VPH no se han estudiado intensamente, ya que muchos han asumido que la carcinogénesis del VPH en la OPSCC es idéntica al mecanismo aceptado de la carcinogénesis del VPH en el cuello uterino; sin embargo, hay muchas diferencias entre el VPH (+) OPSCC y el cáncer de cuello uterino. El VPH (+) OPSCC y el cáncer cervical divergen en factores epidemiológicos, patrones moleculares, tipo de VPH, perfil de mutación, célula de origen, respuesta al tratamiento y comportamiento clínico, lo que sugiere que el cáncer cervicouterino uterino y el OPSCC son distintos(22).

Ciclo de vida del VPH. El primer paso del ciclo de replicación del VPH, llamado "replicación de establecimiento", consiste en mantener un número constante de copias episómicas. La replicación del ADN viral se basa en la maquinaria de replicación del ADN del huésped y está respaldada por las

proteínas virales iniciales E1 y E2. Después de este paso inicial, se inicia la fase de mantenimiento. Esta fase consiste en crear las condiciones para mantener un número constante de genomas virales en los núcleos de células basales no diferenciadas como un genoma extracromosómico para crear una infección persistente. Además de E1 y E2, las oncoproteínas E6 y / o E7 son necesarias para el mantenimiento episomal estable del VPH.

Tras la diferenciación celular en el epitelio estratificado, se inicia la replicación vegetativa o viral, con la posterior producción de viriones de la progenie. Aquí, Las oncoproteínas E6 y E7 expresadas a niveles relativamente bajos en células diferenciadas desempeñan un papel clave al inactivar las proteínas supresoras de tumores. La activación en células epiteliales diferenciadas del promotor tardío, ubicado en la región E7, conduce a la producción de los altos niveles de proteínas virales E1 y E2 requeridas para asegurar la replicación del ADN viral. E4 y E5 contribuyen a una replicación productiva eficiente. Las proteínas de la cápside L1 y L2 se expresan a partir del promotor tardío y están involucradas en la encapsidación de genomas recién replicados, lo que resulta en la liberación de virión en las capas superficiales durante la descamación. E4 también desempeña un papel en este paso del ciclo de vida viral, al interactuar con la red de queratina. El lado derecho de la representación esquemática ilustra que una minoría de las infecciones por VPH se vuelven persistentes(23).



**Figura 6.** Carcinogénesis del VPH.

### **II.3.5 Agentes infecciosos**

Más de 80 diferentes tipos de virus del papiloma humano han sido identificados y existe evidencia que al menos 40 variedades podrían ser clasificadas. Estos virus tienen especial tropismo por los virus que tienen la capacidad para inducir cáncer se denominan “virus oncogénicos”. Estos virus causan entre el 10 y el 15 % de los cánceres humanos. Su principal efecto sobre la inestabilidad genética incluye mutaciones, aberraciones y daño del ADN. Este ADN modificado se vuelve oncogénico o causante de cáncer. Ciertas cepas de virus del papiloma humano han demostrado inducir cáncer cervical y ano genital y se relaciona cada vez más con los cánceres orofaríngeos. Aunque el mecanismo no está totalmente claro, se ha descrito que los productos precoces del gen del VPH E6 y E7 se unen a las proteínas supresoras p53 y/o RB del gen en el queratinocito huésped, haciendo posible de este modo un ciclo celular incontrolado(24).

Biológicamente, la integración de ADN de VPH de alto riesgo en el genoma del huésped puede conducir a la expresión de oncogenes E6 y E7 en la célula huésped; sin embargo, el 60% del OSCC positivo para el VPH puede contener virus extra cromosómico (episomal). El oncogén E6 provoca la degradación de TP53. El oncogén E7 está implicado en la unión y desestabilización del retinoblastoma supresor tumoral (pRb)(16).

### **II.3.6 Sistema inmune y cáncer**

La respuesta inmune cumple un rol en los procesos neoplásicos de invasión tumoral, recurrencia y metástasis. Existen dos clases de respuesta inmune: La respuesta inmune inmediata y la respuesta inmune adaptativa. Las células inmunes responsables de la respuesta inmediata están preparadas para atacar inmediatamente a los patógenos y compuestas por macrófagos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas y células natural killer. Los macrófagos y mastocitos residentes en los tumores liberan factores solubles como citoquinas que atraen a otras células del sistema inmune de respuesta Inmediata de la circulación. Adicionalmente, Células-Presentadoras-de-Antígenos (APCs) que incluyen células dendríticas pueden tomar antígenos de las células neoplásicas y migrar a órganos linfoides donde presentan sus antígenos a células inmunes de respuesta

adaptativas. Las células B de órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos o bazo) reconocen antígenos neoplásicos, se activan, sufren expansión clonal y secretan mediadores solubles que incluyen inmunoglobulinas, citoquinas y activadores de la cascada de complemento (respuesta humoral inmune). Los linfocitos T se movilizan a través de los tejidos buscando complejos de péptidos MHC como los presentes en células neoplásicas (presentados por APCs)(25).

Los linfocitos T maduros citotóxicos (CTL) o CD8 liberan perforina y otras citotoxinas que inducen apoptosis. Existen diferentes subtipos de linfocitos Helper (Th) o CD4, incluyendo Th1, Th2, Th9, Th17, Tregs (Treg y Tr1) y Tfh (linfocito T helper folicular). Los linfocitos Th1 producen citoquinas tales como IL2 e IFN-gamma, relacionados con la activación, desarrollo y persistencia de respuestas de CTL. Los linfocitos Th2 secretan citoquinas tales como IL-4 e IL-10 que juegan un rol en maduración, expansión clonal y cambio de clase de linfocitos B, así como en la inhibición de síntesis de citoquinas Th1. Los Th17 se encuentran asociados con enfermedades autoinmunes, funciones de protección frente a infecciones bacterianas y de hongos. Incluso se debate si los Th17 pudieran estar participando en la respuesta del propio sistema inmune para la eliminación de las células tumorales mediante la secreción de IL21 e IL22. Los Th17 también producen IL17, IL17A e IL17F, que son los responsables del reclutamiento, activación y migración de los neutrófilos. Los linfocitos T helper folicular o Tfh expresan el motivo C-X-C del receptor 5 (CXCR-5) y son localizados en las áreas foliculares de los tejidos linfoides. Tras su interacción con el TCR y su posterior diferenciación, estos Tfh juegan un papel importante en la inmunidad humoral a través de la interacción con linfocitos B. Por último, los linfocitos reguladores o Tregs son una subpoblación especializada cuyo marcaje se puede realizar mediante la expresión de proteína FOXP3 y que actúa suprimiendo la activación de la respuesta inmune protegiendo al organismo frente a respuesta autoinmunes. Las principales citoquinas inmunosupresoras son el TGF-beta y la IL-10. El gran interés de los Tregs radica en su potencial inmunosupresor y su utilidad para evitar rechazos en

trasplantes, en tratamientos contra enfermedades autoinmunes o en potenciar inmunoterapias contra el cáncer(26).

		FUNCTION	IMMUNE MARKER	FINAL RESULT	
Adaptive response	CTLs	Direct tumoral lysis	CD3, CD8	Favorable, directly elimination tumoral cells	
	Th Cells	Th1	Induce response of CTL	CD3, CD4	Favorable, promote a CTL immune response
		Th2	Induce response of B cell	CD3, CD4	Favorable, promote production of antibodies, decrease CTL response
		Th17	Reclute other inflammatory cells through IL-17 production	CD3, CD4, IL-17 intracellular	Additional studies are necessary, however initial study suggests favorable response
	T-supressor	Reduce immune response	CD3, CD4, CD25, FOXP3	Decrease immune response	
	B Cells	Produce antibodies	CD19	Favorable, produce antibodies against	
Innate response	Dendritic Cells	Introduce antigen to T & B cells & produce cytokines	CD11, CD141, CD303	Favorable, induce immune response	
	NK Cells	Direct tumoral lysis	CD16, CD56	Favorable, direct activity against tumoral cells	
	Macrophages	Introduce antigen & phagocytosis	CD14, CD16, CD68, MAC-1 / MAC-3	Favorable, direct cytotoxicity, and induce response of CTL and angiogenesis	
	Neutrophile	Phagocytosis & induce inflammation	CD16, CD66b	Eliminate extracell matriz .	

**Figura 7.** Células del sistema inmune presentes en microambientes tumorales.

### II.3.7 Infiltrado linfocitario tumoral (TIL)

La evidencia acumulada ha enfatizado la necesidad de desarrollar biomarcadores inmunológicos que puedan ofrecer información pronóstica y facilitar la toma de decisiones clínicas. Las células inmunes que se infiltran en el tumor, incluidos los linfocitos T y B, los macrófagos o los neutrófilos pueden tener un efecto negativo o positivo en la expansión del tumor. La evaluación de la dinámica y los roles funcionales de diferentes subconjuntos de células infiltrantes de tumores en el microambiente supresor tumoral podría mejorar nuestro conocimiento de la inmunología y definir subgrupos de pacientes que tienen más probabilidades de responder a la inmunoterapia.

Se cree que los linfocitos citotóxicos infiltrantes de tumor CD8 + son las principales células inmunes efectoras dirigidas contra las células tumorales y se ha demostrado que tienen importancia pronóstica en muchos tumores sólidos. Por otro lado, las células T reguladoras (Tregs) inhiben la respuesta inmune y contrarrestan las células T citotóxicas. Se han informado resultados

inconsistentes con respecto a la importancia pronóstica de Tregs, con varios estudios que muestran asociación con un mal pronóstico en una variedad de neoplasias malignas, incluidos los cánceres de mama, pulmón, cuello uterino y ovario, mientras que otros demuestran una importancia pronóstica favorable, por ejemplo, en el cáncer colorrectal(27).

### **II.3.8 Relación TIL – cáncer orofaríngeo.**

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello es una enfermedad caracterizada por una inmunosupresión profunda. Varios estudios han informado de un aumento significativo de la densidad de TILS en HPV-positivas en comparación con en HPV-negativos OSCC, lo que implica una respuesta inmune antitumoral más potente en los cánceres orofaríngeos asociados al VPH (HPV-OSCC). Esto se ha sugerido como el mecanismo para mejorar el resultado en HPV-OSCC en todos los estudios. Además, los altos niveles de TIL se han asociado con una mejor supervivencia en HPV-OSCC. Curiosamente, los pacientes con enfermedad por VPH positivo y niveles bajos de TIL no mostraron una ventaja de supervivencia en comparación con sus homólogos negativos para el VPH. Por el contrario, se ha demostrado que los pacientes con VPH positivo con TIL alto tienen una supervivencia superior, lo que sugiere el uso de TIL como un biomarcador futuro para la selección de pacientes con tratamiento de desintensificación en la enfermedad con VPH positivo(2).

Estudios realizados indican que una posible explicación para el beneficio de supervivencia puede ser que los linfocitos T infiltrantes de tumores, que impregnan muchos OPSCC positivos para el VPH, confieren un efecto protector a través de una respuesta inmune adaptativa del huésped dirigida contra antígenos virales y células T específicas para E7 del VPH-16. Aunque la abundancia de TIL se asocia con mejores resultados clínicos en varios otros tipos de tumores, su papel en la neoplasia maligna de cabeza y cuello no está bien documentado(28).

### **II.3.9 Factores pronósticos**

Los cánceres de cavidad oral tempranos (estadios I y II) son sumamente curables con cirugía o radioterapia. La elección del tratamiento la dictan los resultados funcionales y cosméticos previstos del tratamiento y la disponibilidad de pericia específica necesaria del cirujano o el oncólogo de radioterapia para el caso del paciente individual. La presencia de un margen positivo o una profundidad del tumor de menos de 5 mm aumenta de manera significativa el riesgo de recidiva local e indica que el tratamiento de modalidad combinada pueda ser beneficioso.

Los cánceres de labio y de cavidad oral avanzados (estadios III y IV) presentan un amplio espectro de retos para el cirujano y el oncólogo de radioterapia. Con la excepción de algunos pacientes con lesiones pequeñas T3 y sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales o distantes, o que no tienen ganglios linfáticos de más de 2 cm de diámetro, para quienes el tratamiento con radioterapia o cirugía solas puede ser apropiado, la mayoría de los pacientes con tumores en estadios III o IV son aptos para un tratamiento combinado de cirugía y radioterapia. Además, puesto que la recidiva local o metástasis a distancia son comunes en este grupo de pacientes, ellos se deberán considerar para participar en ensayos clínicos. Dichos ensayos evalúan la posible función de los modificadores de radiación o quimioterapia combinada con cirugía o radioterapia.

### **II.3.10 Supervivencia**

Los pacientes con cánceres de la cabeza y el cuello tienen una mayor probabilidad de enfermar de un segundo tumor primario en el tracto aerodigestivo superior. La tasa de posibilidad de curación de cánceres de cavidad oral varía según el estadio y el sitio específico. La mayoría de los pacientes presentan cánceres de labio tempranos que son sumamente curables con cirugía o radioterapia, con tasas de curación de 90 a 100 %.

Los cánceres pequeños del trígono retromolar, el paladar duro y la encía superior son sumamente curables con radioterapia o cirugía, con tasas de supervivencia de hasta 100 %. Se pueden lograr tasas de control local de



hasta 90 % con radioterapia o cirugía para cánceres pequeños de la lengua anterior, el piso de la boca y la mucosa bucal. En un estudio se observó que el tratamiento diario de estos pacientes con dosis moderadas de isotretinoína durante un año puede reducir significativamente la incidencia de segundos tumores. Sin embargo, aún no se ha demostrado ninguna ventaja para la supervivencia, debido en parte a la recidiva y la muerte por una neoplasia maligna primaria. En un ensayo adicional, no se observó un beneficio del palmitato de retinol o el palmitato de retinol más  $\beta$ -caroteno cuando se los comparó con el ácido retinoico solo. Los cánceres de orofaringe moderadamente avanzados y avanzados también se pueden controlar efectivamente por medio de cirugía, radioterapia o una combinación de ambas. La selección del tratamiento generalmente la dictan los resultados funcionales esperados del tratamiento. Las lesiones moderadamente avanzadas del triángulo retromolar sin prueba de diseminación hasta los ganglios linfáticos cervicales son habitualmente curables y mostraron tasas de control local de hasta 90 %; las lesiones del paladar duro, encía superior y mucosa tienen una tasa de control local de hasta 80 %. En ausencia de pruebas clínicas de diseminación hasta los ganglios linfáticos cervicales, las lesiones moderadamente avanzadas del piso de la boca y la lengua anterior son generalmente curables, con tasas de supervivencia de hasta 70 y 65 %, respectivamente.

#### **II.4. Glosario de términos**

##### **Biomarcador:**

Un biomarcador es una observación biológica que sustituye e idealmente predice un criterio de valoración clínicamente relevante o un resultado intermedio que es más difícil de observar.

##### **Carcinogénesis:**

La carcinogénesis es el mecanismo para el desarrollo o proceso de crecimiento del cáncer. El daño genético o la mutación es el fundamento de la carcinogénesis.

**Linfocitos infiltrantes de tumor (TIL):**

El TIL por sus siglas en inglés (Tumor-infiltrating lymphocytes), son linfocitos que se localizan de forma nativa en los infiltrados inflamatorios de ciertos tumores.

**Quimioterapia:**

La quimioterapia es el tratamiento con el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas y también interrumpir la formación de células carcinogénicas, puede ser mediante su destrucción o al imposibilitar su multiplicación.

**Tissue Microarrays (TMA):**

El TMA es un microarreglo tisular que se toma a partir de muestras de tejido incluidas en parafina de forma convencional, con un potencial instrumental para la investigación ya que ayuda al análisis de forma masiva del perfil molecular de la patología tumoral.

**Radioterapia:**

La radioterapia es el tratamiento del cáncer con el uso de dosis de rayos X u otras partículas con un alto potencial para destruir las células cancerosas y reducir tumores.

**VPH:**

El virus del papiloma humano es un tipo de virus de ADN de doble hebra no envuelto perteneciente a la familia de los Papillomaviridae que infectan las células epiteliales.

**Xenobiótico:**

Un xenobiótico es toda sustancia química que se localiza dentro de un cuerpo que no se origina naturalmente y que no forme parte de la composición de los organismos vivos.

### III. HIPOTESIS Y VARIABLES

#### III.1. Hipótesis

Los pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello son positivos para el virus del papiloma humano (VPH) y presentan un alto nivel de infiltración linfocitaria tumoral.

#### III.2. Variables

##### Variables independientes:

- VPH
- Infiltrado linfocitario tumoral

##### Variables dependientes:

- Sobrevida del paciente

#### III.3. Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO
Infiltrado linfocitario tumoral	TIL/campo intratumoral promedio	Nominal	V. Independiente
VPH	Inmunohistoquímica P16	Nominal	V. Independiente
Tiempo de sobrevida (meses)	Fecha de último control – Fecha del diagnóstico	Continua	V. Dependiente

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Área de estudio**

El estudio se desarrolló en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. El procedimiento para tinción inmunohistoquímica para p16 se realizó en el Laboratorio de Inmunología y el conteo del nivel de infiltrado linfocitario tumoral se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Banco de Tejidos Tumorales del Departamento de Patología del INEN. El análisis de los datos se llevó a cabo en el Departamento de Investigación.

### **IV.2. Diseño de investigación**

Es un estudio descriptivo con diseño de investigación retrospectivo y transversal.

### **IV.3. Población y muestra**

Se identificaron los pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) con diagnóstico de cuyo cáncer primario fuera de cavidad oral u orofaríngea. Analizamos retrospectivamente 122 casos tratados consecutivamente en el INEN para determinar los efectos de las características clínicas, patológicas, inmunológicas sobre la mortalidad por enfermedad.

### **IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información**

#### **IV.4.1 Selección de muestras biológicas y elaboración de los TMA**

##### **IV.4.1.1 Identificación de las muestras orofaríngeas parafinadas**

Las muestras biológicas embebidas en formol y fijadas en parafina de carcinoma epidermoide orofaríngeo fueron seleccionadas a través del Sistema Informático del INEN (SISINEN). Para ello, se elaboró una base de datos con los datos clínico patológico más relevante. Las muestras fueron

remitidas en calidad de préstamo y por grupos del área de Archivo General de Patología del INEN con la documentación pertinente.



**Figura 8.** Selección de las muestras parafinadas.

#### IV.4.1.2 Preparación de láminas de Hematoxilina-Eosina

Luego de recolectar las muestras parafinadas, se realizó cortes de 3  $\mu\text{m}$  haciendo uso del micrótopo Leica RM2245 para posterior coloración de Hematoxilina-Eosina (HE) según el protocolo; y de esta forma contar con una guía para seleccionar las zonas que deseamos muestrear.



**Figura 9.** Selección de zonas en láminas de HE.

#### IV.4.1.3 Procesamiento de cortes histológicos

La técnica de tissue Microarrays (TMA) proporciona un método de alto rendimiento para estudiar y comparar el perfil molecular y la expresión de una proteína en un gran número de tumores de forma simultánea, a partir de muestras tisulares incluidas en parafina de forma convencional. La principal ventaja del uso de esta técnica es la reducción significativa del tiempo y costos de los procesos. Es posible efectuar un estudio de grandes series de pacientes en un tiempo escaso. Además, permite analizar los tejidos patológicos en las mismas condiciones de trabajo, para mejorar la eficiencia de la investigación. Mediante la revisión por parte de un patólogo, se realizó la selección y marcación de las zonas representativas de cada muestra de tejidos parafinado. Posteriormente se tomaron los núcleos de estas zonas para el diseño de TMA.

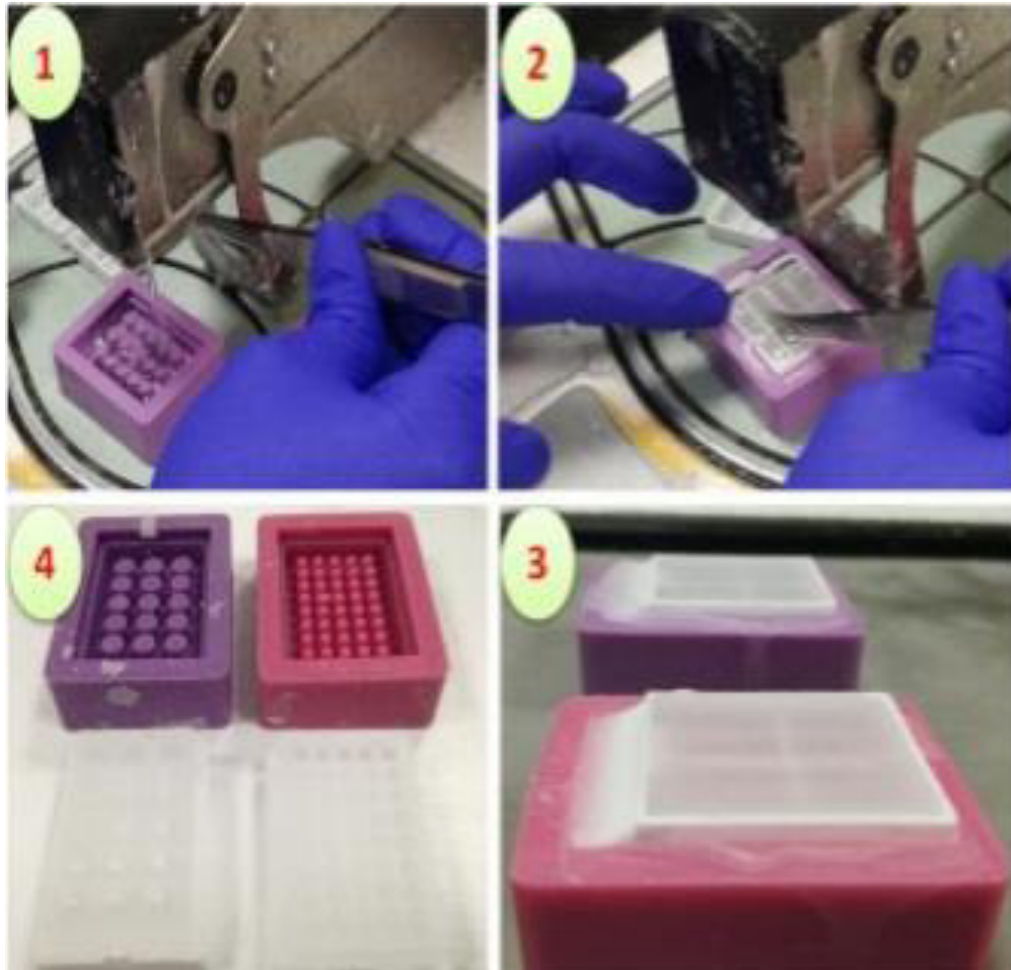
Para efectos del presente estudio, se trabajó con TMA de 12 tejidos por bloque en un orden de 3 x 4 (filas y columnas respectivamente). Para ello, se ordenó todos los casos en grupos de 12 y definimos un orden numérico para cada posición.

TMA 1 COF-VPH/T			
1	2	3	4
17-12992-8	17-19253-R13	17-22488-5	17-20247-5
5	6	7	8
17-20272-6	17-20721-7	17-21349-5	17-21508-7
9	10	11	12
17-21996-4	17-24088-7	17-24717-5	17-28217-7

**Figura 10.** Registro de orden y posición de las muestras en los TMA.

Se trabajó con los moldes (orden 3 x 4) del Sistema Manual Quick-Ray (UNITMA, Korea) y haciendo uso de un equipo de inclusión de parafina. Primero se procedió a la formación de los bloques de parafina según el diseño elegido. Para ello, se precalentó el molde de goma sobre la

superficie del equipo de inclusión para evitar la formación de burbujas. Luego se dispensó la parafina líquida (62 °C) sobre el molde y sellamos con el casete en la zona superior. Posteriormente se llevó el molde sobre una placa fría (-10 °C) alrededor de 30 minutos hasta que se desprenda el bloque de parafina con facilidad y se almacenó en refrigeración (2 °Ca 8 °C) hasta su uso.



**Figura 11.** Proceso de formación de bloques para TMA

Tal como se describió en el apartado anterior, hacemos uso de las láminas de HE con las zonas seleccionadas, para confrontarlas con su bloque de parafina correspondiente y luego se marcó con un rotulador el área seleccionada sobre el bloque. Después seleccionamos el punch específico del molde empleado del Sistema Manual Quick-Ray (UNITMA, Korea) y se

procedió a extraer las muestras de las zonas seleccionadas y ubicarlas en el molde receptor según el orden de la plantilla que previamente se había realizado.



**Figura 12.** Materiales y elaboración de un TMA.

Para este estudio, se utilizó moldes de 3.5 mm x 2.2 mm y zonas de tejidos con un diámetro de 0.4 mm. Es importante, que los tejidos se encuentren a un mismo nivel sobre la superficie del TMA, ya que esto permitirá obtener cortes completos de todos los tejidos que conforman el TMA sobre las láminas y el desgaste excesivo de los mismos. Para finalizar, se selló los TMA en el equipo de inclusión. Primero se sumergió la superficie del TMA sobre parafina líquida (63 grados) a una profundidad de 3 mm aproximadamente durante 15 segundos. Segundo, se retiró el TMA e inmediatamente se colocó la superficie sobre una lámina porta objetos que, a su vez, se encuentra sobre la plancha caliente del equipo de inclusión, durante 20 segundos. Luego, se llevó el bloque juntamente con la lámina portaobjetos, sobre una placa fría (-10 grados) durante 10 minutos aproximadamente o hasta su fácil desprendimiento de la lámina y se mantuvo el TMA en congelación hasta el proceso de microtomía.



#### IV.4.1.4 Cortes de los TMA y preparación de láminas de trabajo

Para este proceso, primero se extrajo los TMA del congelador o placa fría, para colocarlo sobre el cabezal del micrótopo y orientar el bloque de forma paralela a la cuchilla. En segundo lugar, se realizó cortes de 5µm hasta obtener una película uniforme de todos los tejidos incluidos en el TMA. Luego se cambió la medida de corte del equipo a 3 µm para obtener los cortes finos de los tejidos que después fueron extendidas en el baño de flotación y montadas sobre las láminas cargadas. Las láminas se dejaron secar por unos 5 a 10 minutos para proceder con el proceso de inmunohistoquímica.



**Figura 13.** Proceso de corte y montaje en láminas cargadas del TMA.

#### **IV.4.2. Evaluación de P16 por inmunohistoquímica.**

Se realizó la inmunotinción mediante la técnica del protocolo de EnVision FLEX Dako P16. Se empezó dejando las láminas en la estufa a 60°C por 60 minutos para lograr desparafinar los tejidos.

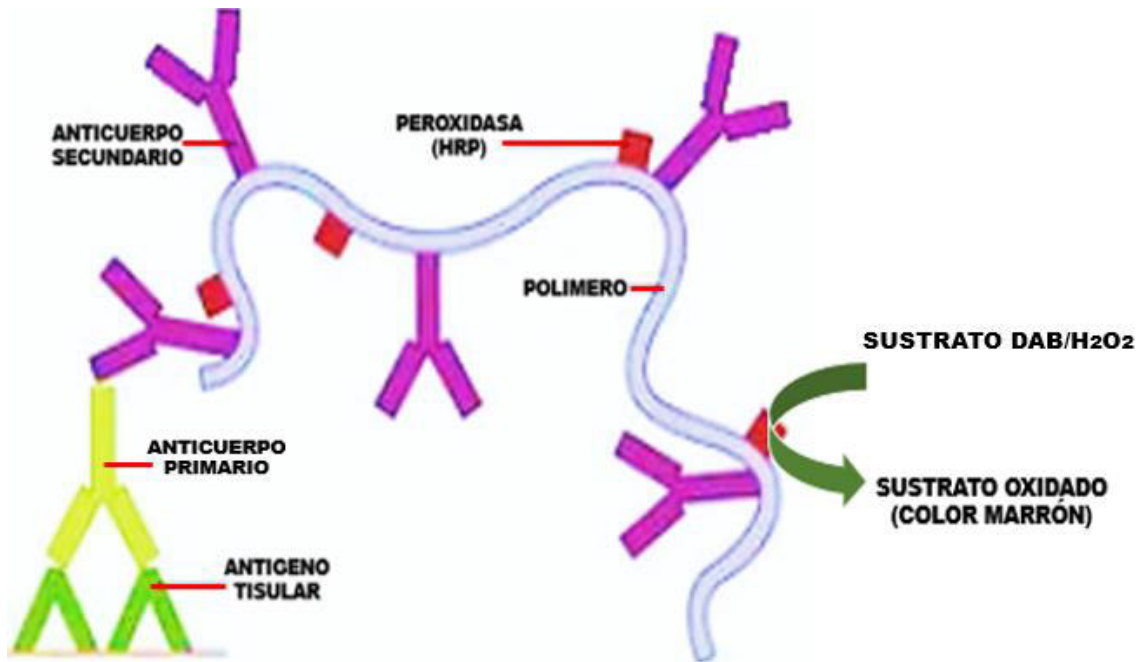
Para remover los remanentes de parafina e hidratar el tejido, fueron sumergidas en xilol y alcohol isopropílico (grado técnico, 70%, 50% y 30%), dejándose lavar en agua por 10 minutos. Se colocó las láminas en la solución recuperadora del epítotope del antígeno P16 inducida por calor, a pH 9.00 (Buffer EDTA), la cual debe estar precalentada a 65°C y llevarlas a 95°C por 20 minutos en baño maría.

Después se dejó enfriar las láminas hasta 65°C. Se retiró las láminas y las colocamos en buffer tris por 5 minutos. Para el bloqueo de las peroxidases endógenas se cubrieron las láminas con solución al 3% de peróxido de hidrógeno y se incubaron por 10 minutos.

Luego se lavó 3 veces las láminas con buffer tris salino. Se dejó en buffer 3 minutos. Se incubó con el anticuerpo monoclonal primario a por 50 minutos. Y se lavó 3 veces las láminas con buffer tris salino y se dejó en buffer 3 minutos.

Después se incubó por 25 minutos con el anticuerpo secundario que esta unido a un soporte principal del polímero dextrano al que se han incorporado un gran número de moléculas de peroxidasa (HRP). Nuevamente se lavó 3 veces las láminas con buffer tris salino. Y se dejó en buffer 3 minutos.

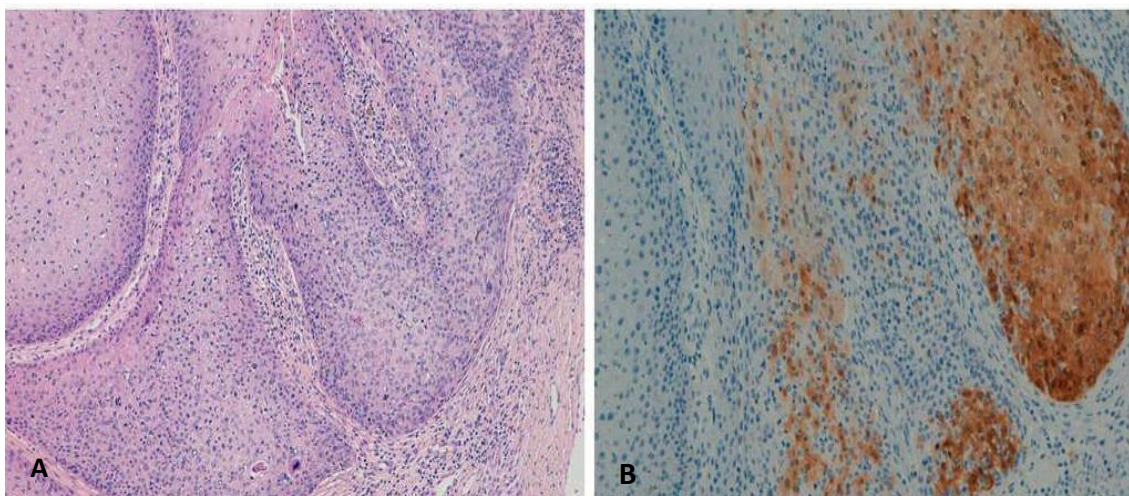
Luego se procedió a incubar con el sistema de sustrato que está formado por dos componentes: el cromógeno diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno por el tiempo de 10 minutos. Y se lavó con agua destilada. El sistema de sustrato produce un producto final marrón dorado en el lugar del antígeno diana reconocido por el anticuerpo primario.



**Figura 14:** Representación esquemática de la técnica de inmunohistoquímica HRP de Dako System.

La contrastación se realizó con hematoxilina de Harris por 20 segundos. Se deshidrató en alcoholes y aclaramos las láminas con xilol. Por último, se realizó el montaje de láminas con Entellan.

La cuantificación de la proporción de P16 se realizó mediante la observación de las láminas con criterios de todo o nada, es decir positivo o negativo, cuando se identificó la coloración marrón dorada en el núcleo y el citoplasma de las células.



**Figura 15:** A. Tejido con p16 negativo. B. Tejido con p16 positivo.

#### **IV.4.3 Evaluación del infiltrado linfocitario tumoral**

Los TIL se cuantificó utilizando un microscopio de la marca Olympus BX63ysoftware VisioPharm Integrator System (versión6.0.0.1765). Se calculó un porcentaje TIL/campo de alta potencia intratumoral promedio ( $\times 400$ ) en las áreas representativas de cada núcleo por triplicado para permitir la heterogeneidad intratumoral. Con ayuda de un patólogo se analizó el porcentaje del TIL de cada paciente, obteniendo una mediana del total de las lecturas del 20% y se categorizo la infiltración de TIL en menor o igual al 20 % y mayor al 20 %.



**Figura 16.** Microscopio Olympus X63.

#### **IV.5. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS Statistics25.0. (LEAD Technologies, Chicago, IL, EE UU). El INEN cuenta con la versión original adquirido en el 2018. Para analizar las características propias de la muestra de estudio, se empleó un análisis estadístico descriptivo utilizando las medidas de centralización y dispersión para las variables cuantitativas. Asimismo, se calculó frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. Y la asociación de las características clínico-patológicas con la tasa de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier; las diferencias entre las categorías se probaron utilizando el log-rank o la prueba de Breslow (Wilcoxon generalizado) según el caso.

## V. RESULTADOS

### V.1 Características clínicas

La población de estudio la conformo un total de 122 pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello. La mediana de edad fue de 62.5 años. La población más frecuente fue la población femenina con 59.02% y la población masculina representó un 40.98 %. El sitio de la neoplasia con mayor frecuencia fue de lengua (94.26%), seguido del paladar (4.09%) y por último la epiglotis y la orofaringe (0.825% cada uno).

La mayoría de la población de estudio requirió cirugía de disección (81.96%) post diagnóstico. El estadio clínico con mayor frecuencia fue el estadio IV (33.60%), seguido del estadio III, II y I (22.13%, 22.13% y 21.31% respectivamente) y por último el estadio 0 con 0.86%. Con respecto al tratamiento que recibieron los pacientes el de mayor frecuencia fue radioterapia (53,27%). El 70,49% de la población no presento recurrencia alguna mientras que el 29,51% si la presento. El porcentaje de fallecidos de la población fue de 55,73%.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019.

<b>Características</b>	<b>n=122</b>	<b>%</b>
<b>Edad</b>		
Media	59.97	
Mediana	62.5	
<b>Genero</b>		
Masculino	50	40.98
Femenino	72	59.02
<b>Sitio de la neoplasia</b>		
Lengua	115	94.26
Paladar	5	4.09
Epiglotis	1	0.825
Orofaringe	1	0.825
<b>Disección de cuello</b>		
No	22	18.04
Si	100	81.96

<b>Estadio Clínico</b>		
0	1	0.86
I	26	21.31
II	27	22.13
III	27	22.13
IV	41	33.60
<b>Tratamiento</b>		
N/A	31	25.42
Quimioterapia (QT) + Radioterapia (RT)	26	21.31
Radioterapia (RT)	65	53.27
<b>Recurrencia</b>		
No	86	70.49
Si	36	29.51
<b>Status</b>		
No	54	44.27
Si	68	55.73

## V.2 Características patológicas

En las características patológicas se pudo notar que el grado histológico moderadamente diferenciado fue el de mayor frecuencia (67,21%), seguido del grado histológico bien diferenciado y poco diferenciado (26,22% y 6.57% respectivamente). Se pudo notar que la mayoría de los pacientes del estudio tuvieron una neoplasia queratinizante (91%) y ulcerada (82,79). Los T patológico más frecuente fueron el 2 y 1 (45,9% y 35,24% respectivamente), en los N patológicos fue el 0 (51,63%) y en cuanto al M patológico el 100% fue 0.

La invasión perineural (IPN) en los pacientes representó un porcentaje 51,63%, mientras que la invasión linfovascular (ILV) fue de un 32,78%. Se pudo observar que 54,09% de la población de estudio tenía los ganglios comprometidos.

**Tabla 2.** Características patológicas de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019.

<b>Características</b>	<b>n=122</b>	<b>%</b>
<b>Grado histológico</b>		
Bien diferenciado	32	26.22
Moderadamente diferenciado	82	67.21
Poco diferenciado	8	6.57
<b>Queratinizante</b>		
No	11	9
Si	111	91
<b>Ulcerado</b>		
No	21	17.21
Si	101	82.79
<b>T patológico</b>		
0	2	1.63
1	43	35.24
2	56	45.9
3	16	13.11
4	5	4.12
<b>N patológico</b>		
0	63	51.63
1	20	16.4
2	39	31.97
<b>M patológico</b>		
0	122	100
1	0	0
<b>IPN</b>		
No	59	48.37
Si	63	51.63
<b>ILV</b>		
No	82	67.22
Si	40	32.78
<b>Bordes</b>		
Libres	97	79.5
Cercanos	16	13.11
Comprometidos	9	7.39
<b>Ganglios comprometidos</b>		
Negativos	56	45.91
Positivos	66	54.09



### V.3 Biomarcadores

Respecto a los biomarcadores de factor pronóstico estudiados se obtuvo: en el infiltrado linfocitario tumoral una mediana de 20%. Se dividió en grupos de acuerdo con la mediana obtenida, siendo el primer grupo de pacientes con TIL menor o igual a 20 % y el otro grupo mayor a 20 %, conformando el 57.37 % y el 42.63 % respectivamente para cada grupo.

**Tabla 3.** Estado del infiltrado linfocitario y P16 de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados en el INEN entre 2007-2019.

Biomarcadores	n=122	%
<b>TIL (%)</b>		
Mediana	20	
≤20	70	57.37
>20	52	42.63
<b>P16</b>		
Negativo	114	93.44
Positivo	8	6.56

**Tabla 4.** Ubicación de la neoplasia en pacientes con VPH (+).

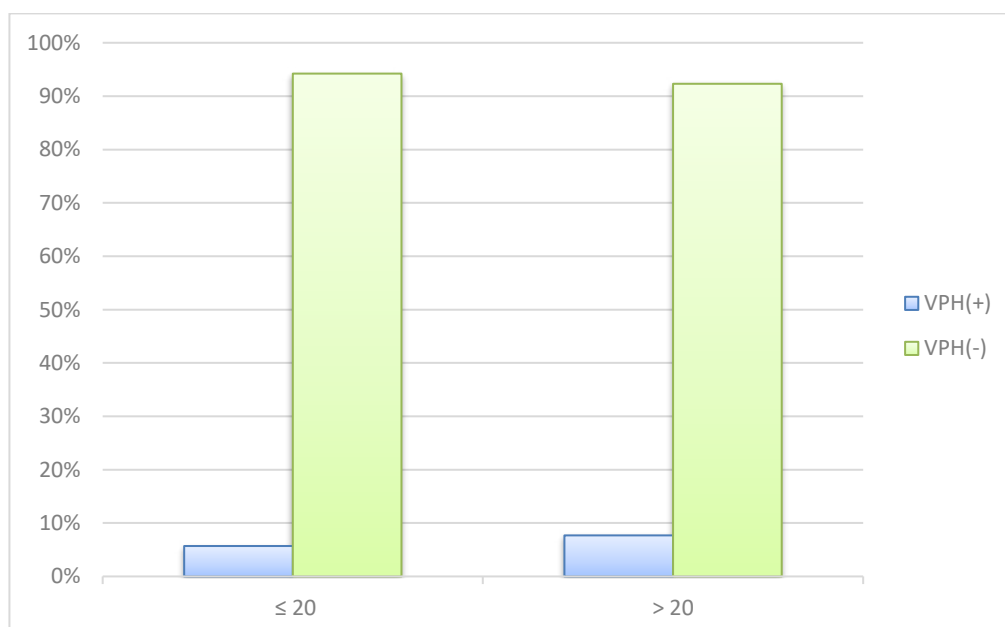
Ubicación de la neoplasia	Pacientes VPH(+)
Paladar duro	1
Paladar blando	1
Tercio medio del borde lateral derecho de la lengua	3
Tercio medio del borde lateral izquierdo de la lengua	2
Totalidad de la hemilengua posterior derecha	1
Total	8



**Tabla 5.** Nivel de infiltrado linfocitario tumoral y presencia de VPH.

TIL	Estado de VPH		TOTAL	p-value
	VPH (+)	VPH (-)		
≤ 20%	4	66	70	0.947
>20%	4	48	52	
Total	8	114	122	

- El grupo de pacientes con TIL menor o igual a 20 presento cuatro pacientes con VPH(+) que represento el 5,71% y 66 pacientes con VPH(-) que represento el 94,29%.
- El grupo de pacientes con TIL mayor a 20 presento cuatro pacientes con VPH(+) que represento el 7,69% y 48 pacientes con VPH(-) que represento el 92.31 %.
- El p-value demostró que no hubo significancia entre la asociación del TIL y la frecuencia del VPH en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, siendo el  $p=0.947$  el cual es mayor al nivel de significación establecido ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 17.** Porcentaje de pacientes VPH +/- de acuerdo con su TIL.

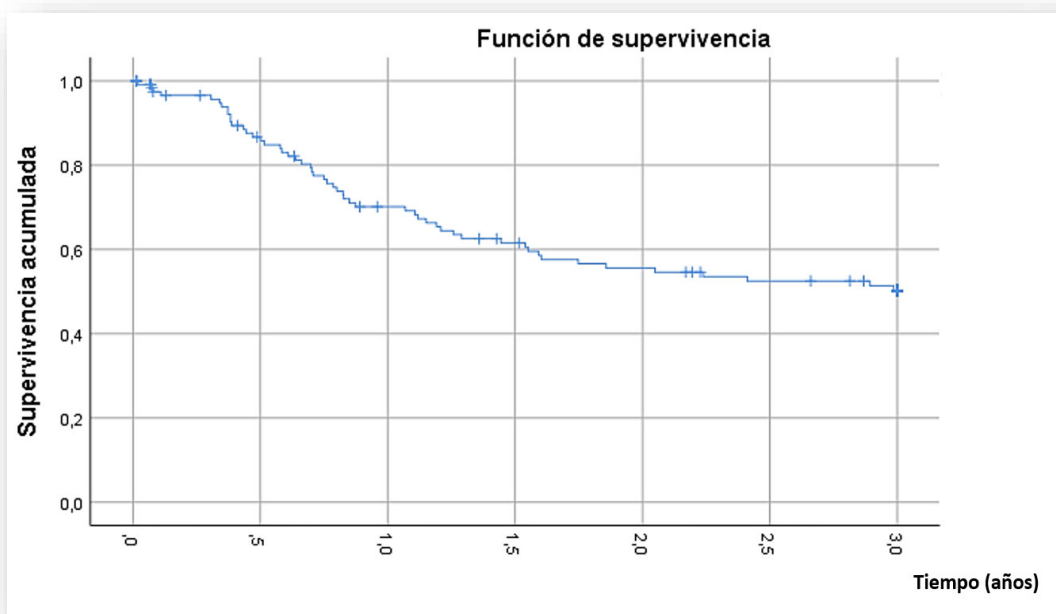
#### V.4 Sobrevida global a los 3 años

La mediana de seguimiento fue de 46.8 (rango: 6-120) meses. La población de estudio (n=122) tuvo una supervivencia global (SG) a los 3 años del 56,6%.

**Tabla 6.** Porcentaje de sobrevida global de los pacientes

Estado	n=122	SG-3años
Vivo	69	56,6%
Muerto	53	

En la gráfica de la curva de Kaplan-Meier para la mortalidad de los pacientes fue de un 43,4 % del total.



**Figura 18.** Porcentaje de sobrevida de los pacientes de acuerdo con los años.

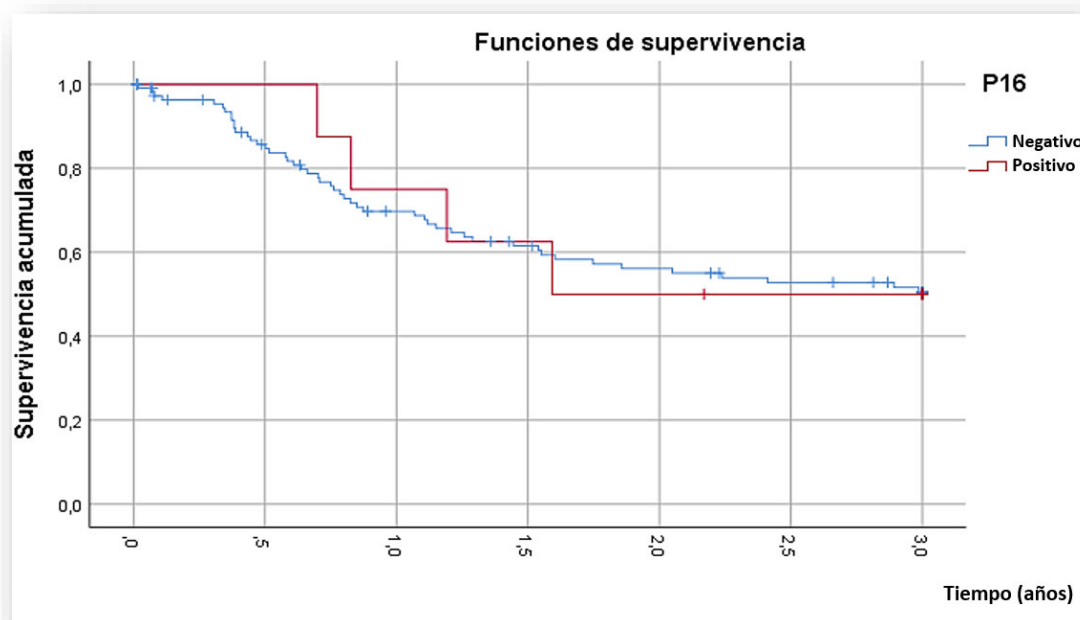
### V.5 Sobrevida global en relación con el P16

Los pacientes con P16 negativo tuvieron una supervivencia a 3 años del 57 %, y hubo un total de 49 fallecidos que representa el 43 % del total de pacientes con P16 negativo. En cuanto a los pacientes con P16 positivo tuvieron una supervivencia a 3 años del 50 % y hubo un total de 4 fallecidos que representa el 50 % del total de pacientes con P16 positivo.

**Tabla 7.** Relación de la sobrevida de los pacientes y P16.

P16	N total	Muertos	Vivos	
			N	Porcentaje
Negativo	114	49	65	57,0%
Positivo	8	4	4	50,0%
Total	122	53	69	56,6%

Las curvas de Kaplan-Meier para la mortalidad por cáncer de cabeza y cuello estratificadas según el estado del VPH muestran una supervivencia similar en pacientes con tumores P16 negativo y P16 positivo.



**Figura 19.** Porcentaje de sobrevida de los pacientes en relación con el P16.

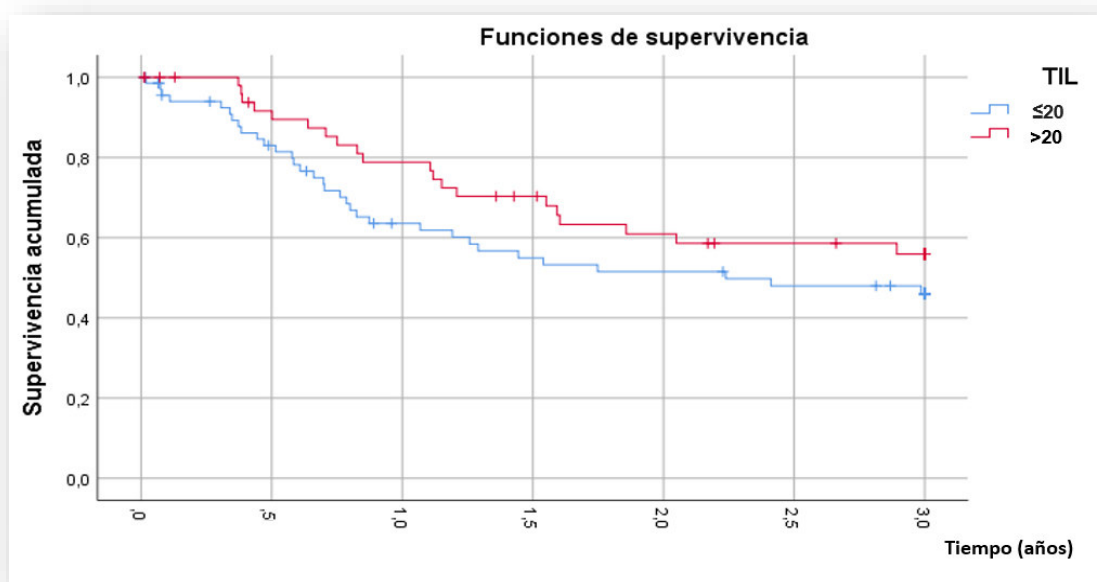
## V.6 Sobrevida global con relación al TIL

Los pacientes con TIL menos o igual a 20 tuvieron una supervivencia a 3 años del 52,9 %, y hubo un total de 33 fallecidos que representa el 47,1 % del total de pacientes con TIL  $\leq 20$ . En cuanto a los pacientes con TIL mayor a 20 una supervivencia a 3 años del 61,5 % y hubo un total de 20 fallecidos que representa el 38,5 % del total de pacientes con P16 positivo.

**Tabla 8.** Relación de la sobrevida de los pacientes y TIL

TIL	N total	Muertos	Vivos	
			N	Porcentaje
$\leq 20$	70	33	37	52,9%
$>20$	52	20	32	61,5%
Total	122	53	69	56,6%

Las curvas de Kaplan-Meier para la mortalidad por cáncer de cabeza y cuello según los niveles TIL no representan una diferencia significativa para entre el grupo de los pacientes con TIL mayor igual al 20% y los pacientes con TIL menor igual al 20 %.



**Figura 20.** Porcentaje de sobrevida de los pacientes con relación a su TIL.

**Tabla 9.** Presencia de VPH y TIL con relación a la supervivencia.

Biomarcador		Supervivencia a 3 años (56,6 %)	P-value
<b>P 16</b>	VPH(-)	57 %	0,768
	VPH(+)	50 %	
<b>TIL</b>	≤20	52,9 %	0,112
	>20	61,5 %	

En la asociación de la relación entre el P16 y la supervivencia; el p-value demostró que no hubo significancia en la muestra de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, siendo el  $p=0.768$  el cual es mayor al nivel de significación establecido ( $p \leq 0.05$ ). Y en cuanto a la asociación entre el TIL y la supervivencia; el p-value demostró que no hubo significancia en la muestra, siendo el  $p=0.112$  el cual es mayor al nivel de significación establecido ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, el grupo con un nivel de infiltrado más alto reportó un mayor porcentaje de sobrevida sobre el grupo con menor infiltrado linfocitario.

## VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio, el biomarcador P16 relacionado con la presencia del virus del papiloma humano asociados a riesgo oncogénico fue detectado en el 6.5 % de un total de 122 pacientes, mediante tinción de inmunohistoquímica. Estos resultados tienen coincidencia con otros estudios realizados por ejemplo en México por Villagómez y col.(29) donde se llevó a cabo un estudio observacional, transversal y descriptivo, que incluyó un total de 45 pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello. Determinaron la prevalencia de infección por VPH en pacientes con carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. La asociación entre el carcinoma de células escamosas con VPH se aisló en 2 pacientes, lo cual llegó a representar una prevalencia global del 4.4% en dicha población; otro estudio retrospectivo realizado por Dogantemur y col.(30); donde se incluyó a 90 pacientes con carcinoma epidermoide en estadio avanzado. La presencia de VPH se investigó por proteína16 con método inmunohistoquímico y policlonalmente por reacción en cadena de la polimerasa. Se determinó que seis de los casos, tenían positividad tanto para el VPH como para la proteína16 representando el 6,6% de la muestra estudiada.

En contraste, otros estudios han reportado una mayor frecuencia del virus del papiloma humano. En Estados Unidos, Lewis y col.(31) evaluaron 239 casos de carcinomas escamosos orofaríngeos que fueron analizados por inmunohistoquímica para P16. Del total de casos, 187 (78%) fueron positivos para p16. Y otro estudio realizado por Meshman y col.(32); donde evaluaron la importancia pronóstica de la expresión de p16 entre pacientes con carcinoma de células escamosas de laringe e hipofaringe. Identificaron 31 pacientes de los cuales catorce (45.2%) pacientes fueron p16 positivos; diecisiete (54.8%) fueron p16 negativos. Y por último un estudio realizado en Australia por Hong(33); donde incluyeron 270 pacientes con diagnóstico patológico de carcinoma de células escamosas orofaríngeas, determinaron que el 37% de los cánceres fueron positivos al VPH (91% tipo 16).

En este estudio realizado no se obtuvo significancia en la asociación del nivel de infiltrado linfocitario en relación con la supervivencia desarrollada en un modelo de pronóstico para la mortalidad a 3 años mediante el análisis de regresión logística. Dichos resultados tienen concomitancia con el estudio realizado por De Ruiter y col.(34) donde incluyeron un total de 161 pacientes de los cuales 80 eran pacientes con cáncer orofaríngeo, 52 hipofaríngeos y 29 pacientes con cáncer de laringe. La cohorte de pacientes tenía una supervivencia general (SG) a 3 años del 58%, ninguno de los marcadores de células T mostró una correlación con la supervivencia general. Se pudo visualizar que existe una tendencia a encontrar una asociación, pero una limitación observada que se presenta en los estudios de biomarcadores pronósticos en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC por sus siglas en inglés) es el uso de cohortes de pacientes heterogéneas con respecto a la modalidad de tratamiento, estadio tumoral, subtipo tumoral y estado del VPH y / o un pequeño número de sujetos de estudio. Además, se carece de consenso sobre los puntos de corte sólidos, porque el método de evaluación de TIL varía mucho entre los estudios.

Sin embargo, en otras investigaciones se puede demostrar que si existe dicha asociación como el estudio realizado en China por Zheng y col.(35) donde se llevó a cabo una búsqueda en plataformas virtuales como PubMed, Embase y la Biblioteca Cochrane para identificar estudios que evalúen el efecto de los TIL en la supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Se resumieron los datos de 22 estudios observacionales que incluyeron 2909 pacientes. El análisis agrupado indicó que los TIL generalizados eran marcadores pronósticos favorables para la supervivencia general en pacientes con cáncer de esófago (CE). Para los subconjuntos de TIL, los TIL CD8+ se asociaron con una supervivencia general mejorada. Además, los resultados agrupados mostraron que otros subconjuntos de TIL incluyendo CD3+ y CD4+ no estaban asociados con la supervivencia de los pacientes. Se confirmó que el alto nivel de TIL generalizadas se asoció con una mejor supervivencia en pacientes con CE. Dado que cada uno de los subconjuntos de TIL tiene diferentes roles en la progresión de la CE están involucrados con los resultados clínicos, otros no.

En relación con la asociación del impacto pronóstico del estado del virus del papiloma humano en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello estudiados en el presente trabajo y la supervivencia general no se encontró significancia. De igual forma que en este estudio, se encontró una investigación realizada por Aguirre y col.(36) con similares resultados. Su estudio evaluó la prevalencia de VPH en 346 casos de carcinoma de células escamosas orofaríngeas diagnosticados en el hospital público de oncología más grande de Brasil, el Instituto Nacional del Cáncer de Brasil y su correlación con la supervivencia general en cinco años. Pudieron evidenciar la baja frecuencia de casos positivos de VPH (6,1%) y determinaron que la infección por VPH no tuvo impacto en la supervivencia general de los pacientes con cáncer de orofaringe.

No obstante, diferentes estudios y revisiones bibliográficas mencionan que el cáncer de orofaringe positivo para el virus del papiloma humano se asocia con una mejor supervivencia en comparación con la enfermedad negativa para el virus del papiloma humano. Como lo menciona en una revisión el investigador Ramqvist y col.(37) donde reportó que los pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas orofaríngeas en amígdalas y base de lengua positivos para el VPH tuvieron un resultado clínico mucho mejor que aquellos con cáncer correspondiente al VPH negativo y otros tipos de cáncer de cabeza y cuello. Más específicamente, la supervivencia fue de alrededor del 80% para la enfermedad con VPH positivo versus 40% de supervivencia sin enfermedad a cinco años. Otro estudio hecho en Francia por Augustin y col.(38) donde incluyeron a 372 pacientes, determinaron que la presencia de la infección por VPH se asoció significativamente con una mejor supervivencia para los tumores orofaríngeos. Heusinkveld y col.(39) propusieron que una explicación plausible de las diferencias en la supervivencia entre pacientes con VPH positivo y negativo para VPH es que los tumores impulsados por virus provocan una respuesta inmune adaptativa dirigida contra antígenos virales expresados en tumores: es menos probable que se supriman las respuestas inmunitarias contra el antígeno viral extraño.



## **VII. CONCLUSIONES**

- Se identificaron dos grupos con alto y bajo grado de infiltrado linfocitario, y se reportó un menor tiempo de supervivencia en los pacientes con bajo nivel de TIL.
- Se demostró la presencia del virus de papiloma humano en pacientes con cáncer de cabeza y cuello hallándose una prevalencia del 6,5%.
- No se identificó una relación significativa entre los biomarcadores de P16 o TIL y una mejor supervivencia en la población estudiada.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- En el presente estudio no se encontró relación en la significancia de los biomarcadores estudiado, por ello se recomienda realizar estudios relacionados al tema con una mayor cantidad de población.
- En este estudio se tomaron muestras de diferentes zonas de los canceres de cabeza y cuello, se recomienda tomar en futuros estudios a realizar, localizaciones de tumores más específicas.
- Y por último se recomienda analizar de manera más específica mediante pruebas moleculares los diferentes subtipos del VPH.

## **IX. FINANCIAMIENTO**

Este estudio fue apoyado y financiado por CIENCIACTIVA-CONCYTEC, bajo el contrato FONDECYT 096-2017 por el proyecto titulado “BIOMARKERS OF HPV DRIVEN HEAD AND NECK CANCER IN LATIN AMERICA AND EUROPE”.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Ang K, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal D, Nguyen-Tan P, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363 (1): 24–35.
2. Ward M, Thirdborough S, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*. 2014; 110: 489–500. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169344> [Consultado el 26 de octubre de 2019].
3. D'Souza G, Kreimer A, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch W, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356 (19): 1944–1956.
4. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C, et al. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 2005; 65 (23): 11146–11155.
5. Gooden M, De Bock G, Leffers N, Daemen T, Nijman H. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011; 105 (1): 93–103.
6. Brandwein-Gensler M, Teixeira M, Lewis C, Lee B, Rolnitzky L, Hille J, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29 : 167–178. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15644773> [Consultado el 21 de enero de 2019].
7. Chaturvedi A, Engels E, Pfeiffer R, Hernandez B, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011; 29 (32): 4294–4301.
8. Gillison M, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra W, Trotti A, et al. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2012; 30 (17): 2102–2111.
9. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, Van Doorn L, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *Int J Cancer*. 2012; 131 (5): 1179–1186.
10. Liang C, Marsit C, McClean M, Nelson H, Christensen B, Haddad R. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012; 72 (19): 5004–5013.

11. Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16—associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012; 122 (1): 121–127.
12. McDermott J, Bowles D. Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Current Treatment Options in Oncology*. 2019; 20 (5): 43.
13. Maley C, Aktipis A, Graham T, Sottoriva A, Boddy A, Janiszewska M, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17 (10): 605–19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811185/> [Consultado el 16 de setiembre de 2019].
14. Andía R. Prevalencia del cáncer oral en pacientes atendidos en el I.R.E.N. Sur-Arequipa del 2010 al 2016. Disponible en: [http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/6131/1/T059\\_73136144\\_T.pdf](http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/6131/1/T059_73136144_T.pdf) [Consultado el 16 de junio de 2019].
15. Instituto Nacional Del Cáncer. Cánceres de cabeza y cuello. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello> [Consultado el 16 de junio de 2019].
16. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrri A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101 (6): 412–423. Disponible en: [doi.org/10.1093/jnci/djp017](https://doi.org/10.1093/jnci/djp017).
17. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Datos epidemiológicos. Disponible en: <https://portal.inen.sld.pe/indicadores-anuales-de-gestion-produccion-hospitalaria/> [Consultado el 08 de julio de 2019].
18. IARC – GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations> [Consultado 15 de junio de 2019].
19. American Cancer Society. If you have head or neck cancer. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-orofaringe-y-de-cavidad-oral/si-usted-tiene-cancer-de-cabeza-o-cuello.html> [Consultado el 11 de junio de 2019].
20. Winship Cancer Institute. Genes del Cáncer. Disponible en: <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/genes-de-cancer> [Consultado el 1 de junio de 2019].
21. Thomson P. Pre-Cáncer Oral, diagnóstico y tratamiento de lesiones potencialmente malignas. Madrid: Amolca; 2015.
22. Álvarez A, Sepúlveda J, Siller F. Human Papilloma Virus - Induced carcinogenesis. *Investigación Andina*. 2012; 14 (24): 438–56.

23. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2014; 26: 13–21.
24. García A. Prevalencia de carcinoma epidermoide oral en Pacientes de dos hospitales de Salud Pública -Perú en el Período 2006- 2009. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2163> [Consultado el 15 de junio de 2019].
25. Castaneda C, Castillo M, Arboleda P, Belmar-Lopez C, Nuñez T, Casavilca S. Evaluación e implicancia de la respuesta inmune dirigida contra el cáncer. *Acta Cancerológica*. 2014; 43(2): 17 - 23.
26. Luckheeram R, Zhou R, Verma A, Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*. 2012; 2012: 12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/925135>.
27. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006; 313: 1960–4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008531>. [Consultado el 11 de octubre de 2019].
28. Ou D, Adam J, Garberis I, Blanchard P, Nguyen F, Levy A, et al. Clinical relevance of tumor infiltrating lymphocytes, PD-L1 expression and correlation with HPV/p16 in head and neck cancer treated with bio- or chemo-radiotherapy. *Oncoimmunology*. 2017; 6: 9 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28932643> [Consultado el 13 setiembre de 2019].
29. Villagómez V, Paz D, Marino I, Ceseñas A, Sandoval A, Reyes A. Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. *Cirugía y Cirujanos*. 2016; 84 (5): 363–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000974111600013X> [Consultado el 27 de febrero de 2020].
30. Dogantemur S, Ozdemir S, Uguz A, Surmelioglu O, Dagkiran M, Tarkan O, et al. Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in advanced stage laryngeal cancer patients and prognostic significance. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2019 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1808869419301533> [Consultado el 27 de febrero de 2020].
31. Lewis J, Thorstad W, Chernock R, Haughey B, Yip J, Zhang Q, et al. P16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: An entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *American Journal of Surgical Pathology*. 2010; 34 (8): 1088-1096.
32. Meshman J, Wang P, Chin R, John M, Abemayor E, Bhuta S. Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *American Journal of Otolaryngology*. 2017; 38 (1): 31-37.

33. Hong A, Dobbins T, Lee C, Jones D, Jackson E, Clark J, et al. Relationships between epidermal growth factor receptor expression and human papillomavirus status as markers of prognosis in oropharyngeal cancer. *European J Cancer*. 2010 ; 46 (11): 2088–96. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804910003382> [Consultado el 28 de febrero de 2020].
34. De Ruiter E, De Roest R, Brakenhoff R, Leemans C, De Bree R, Terhaard C, et al. Digital pathology-aided assessment of tumor-infiltrating T lymphocytes in advanced stage, HPV-negative head and neck tumors. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2019 Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02481-3> [Consultado el 2 de marzo de 2020].
35. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Hu W, Zhou Q, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophagus Cancer: a Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 45 (2): 720–732.
36. Aguirre L, Coelho S, Brennan P, Valverde P, De Souza M, Nascimento F, et al. Hpv Impact On Oropharyngeal Cancer Patients Treated At The Largest Cancer Center From Brazil. *Cancer Letters*. 2020. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383520300860?via%3Dihub> [Consultado el 2 de marzo de 2020].
37. Ramqvist T, Grun N, Dalianis T. Human papilloma virus and tonsillar and base of tongue cancer. *Viruses*. 2015; 7 (3): 1332-1343.
38. Augustin J, Outh-Gauer S, Mandavit M, Lépine C, Broudin C, Hans S, et al. Study of the Human Papillomavirus (HPV) prevalence in head and neck carcinomas in a French monocentric cohort of 372 patients. *Annales de Pathologie*. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32081547> [Consultado el 2 de marzo de 2020].
39. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet R, Gelderblom H, Nortier J, Gorter A, et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131 (2): E74–E85.

## XI. ANEXOS

### XI.1 Aprobación de Comité Revisor de Protocolos del INEN



PERÚ

Ministerio  
de Salud



"AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

Surquillo, 08 de Marzo de 2018

CARTA N° 030 - 2018-CRP-DI-DICON/INEN

M.C.  
**CARLOS CASTAÑEDAD ALTAMIRANO**  
Investigador Principal  
Presente.-


De nuestra consideración:

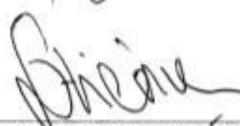
Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente e informarle que el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN, ha revisado y aprueba el trabajo de Investigación Titulado: "BIOMARCADORES DE CANCER DE CABEZA Y CUELLO IMPULSADOS POR VPH EN AMÉRICA LATINA Y EUROPA". INEN 18-26

De acuerdo con las normas deberá presentar un informe sobre los avances del dicho proyecto, así como las conclusiones del mismo a esta Oficina.

Esperando la respuesta para la respectiva aprobación, quedamos de Usted.


Atentamente,


  
M.C. Vásquez Chávez Jule  
Presidente del Comité Revisor

  
M.C. José Carlos Gutiérrez Lazarte  
Miembro del Comité Revisor



  
Mg. Sandro Casavilca Zambrano  
Miembro del Comité Revisor

  
M.C. Marga López Contreras  
Miembro del Comité Revisor

  
M.C. Alberto Lachos Dávila  
Miembro del Comité Revisor

## **XI.2 Herramientas utilizadas para recolección de datos**

### **a.- Formato de solicitud de historias clínicas (HC)**

#### **SOLICITUD DE HISTORIAS CLÍNICAS**

DEPARTAMENTO: \_\_\_\_\_

Investigador Principal: \_\_\_\_\_

Proyecto: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

(Adjuntar listado de pacientes)



**b.- Formato de solicitud de tacos parafinados.**

**SOLICITUD DE TACOS PARAFINADOS**

**Dr. Hugo Fuentes Rivera**

Director Ejecutivo

Departamento de Investigación

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**Asunto: Solicitud de tacos de patología**

Presente.-

Estimado Dr. Fuentes,

Por intermedio del presente lo saludo cordialmente y a la vez solicitarle el visto bueno de la solicitud de tacos de patología presentados en la lista adjunta. Este material es necesario para la ejecución del proyecto \_\_\_\_\_ con número de aprobación del Comité Revisor de Protocolos Institucional N° INEN \_\_\_\_\_.

Agradeciendo la atención a la presente, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más sentida consideración.

Atentamente,

.....

Investigador Principal