

1/346/97
Rev Col Cancerol
(1):11-21. 198

TITULO : EXPRESION DE ANTIGENOS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD, NIVELES DE PROTEINA TRANSPORTADORA DE RETINOL Y PRESENCIA DE PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE CAVIDAD ORAL.

PRESENTADO POR :

OSCAR OROZCO DIAZ. MD.

AMPARO SERNA ALARCON. BS.

PSEUDÓNIMO :

OSAM

CON LA COLABORACION DE :

OLGA LUCIA GUTIERREZ, HUGO ARIAS PULIDO, ALBA LUCIA COMBITA, SANDRA QUIJANO, CARLOS SAAVEDRA, SERGIO ZUÑIGA.

LUGAR DE LA INVESTIGACION :

Laboratorio de inmunología. Instituto Nacional de Cancerología.

Santafe de Bogotá, Colombia.

Major complex histocompatibility Expression
retinol bearing protein levels and human
Papillomavirus in oral cavity. Squamous cell carcinoma

1992

RESUMEN

TITULO :

Expresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), niveles de Proteína transportadora de Retinol y presencia de Papilomavirus humano en Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral.

PSEUDONIMO :

OSAM

OBJETIVO :

Este es un reporte parcial en donde por medio del estudio de algunos aspectos inmunológicos y moleculares, se pretende entender un poco más la biología y la historia natural del Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, con miras a aportar nuevos conceptos en cuanto al pronóstico, seguimiento y manejo del paciente oncológico.

POBLACION :

Se estudiaron 10 pacientes con diagnóstico de Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, a los cuales se les tomaron biopsias de las lesiones para la detección de DNA de HPV y análisis de moléculas de histocompatibilidad y muestras de suero para la detección de anticuerpos anti- HPV y concentraciones de proteína transportadora de Retinol.

MATERIALES Y METODOS :

Sobre cortes hechos a partir de las biopsias, se realizó el análisis histopatológico de las lesiones, por medio de coloración de Hematoxilina-eosina, y la detección de moléculas de histocompatibilidad por la técnica inmunoperoxidasa (Vectastain ABC). Los anticuerpos empleados fueron: W6/32 (Para antígenos de clase I, que reconoce el complejo HLA-A, B, C- β 2 microglobulina); L243 (Para antígenos clase II, que reconoce el determinante monomórfico DR) y Anticuerpo anti CD58/LFA3 (Para antígeno de función leucocitaria).

Luego de una extracción del DNA de los cortes de tejido se realizó una PCR según el método de Walboomers 1995 (Primers biotinados GP5+/GP6+), Como control positivo se empleó DNA de líneas celulares SiHa y HeLa y como control negativo DNA de tiroides humana. La detección genérica de los amplímeros fue realizada por Southern blot utilizando el método de Walboomers 1995, con revelado no radioactivo luminiscente. La detección tipo específica fue realizada mediante un ensayo de (EIA) siguiendo la metodología de Jacobs 1995, utilizando oligosondas de HPV 16 y 18 marcadas con digoxigenina, leídas por colorimetría.

A partir de los sueros de los pacientes se determinaron los niveles de proteína transportadora de retinol (PTR) empleando el Kit de ELISA (UBI-MAGIWEL) y la respuesta de anticuerpos anti- HPV también por un ensayo de ELISA, utilizando como antígeno las proteínas recombinantes: MBP-E7/HPV 11, 16 y 18, cuyas condiciones se habían estandarizado previamente.

RESULTADOS :

De los 10 casos analizados, 5 correspondían a hombres y 5 a mujeres, el rango de edades fue amplio y a todos se les confirmó el diagnóstico de Carcinoma Escamocelular. El tiempo de

evolución de las lesiones en 3 pacientes superaba los 12 meses y sólo 3 presentaban concomitantemente lesiones premalignas.

En cuanto a la presencia de factores de riesgo como consumo de tabaco y alcohol por periodos superiores a 12 meses, se observó en 5 y 3 de los pacientes respectivamente.

La detección genérica para DNA de HPV fue positiva para 2 casos, uno de los cuales fue positivo en EIA con las sondas HPV 6/11, y en la otra no se logró determinar el tipo viral con las sondas disponibles.

El análisis inmunohistoquímico mostró expresión variada con los anticuerpos utilizados en las células tumorales, pero en general se notó una disminución de las MHC clase I, sobre todo en los casos positivos para DNA de HPV. Para moléculas de clase II y LFA3 se notó una expresión moderada.

En las muestras de suero de los pacientes no se encontró presencia de anticuerpos anti-HPV con los antígenos utilizados y las concentraciones de PTR se encontraron en general disminuidas con respecto a los controles.

CONCLUSIONES :

Los hallazgos en cuanto al consumo de tabaco y alcohol ratifican la asociación que existe entre estos factores de riesgo y el desarrollo de la neoplasia. Sin embargo, los dos casos positivos para HPV no presentaban exposición aparente a estos factores sugiriendo que estos pueden representar un pequeño grupo de pacientes con Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral en el cual HPV juega un papel central en el desarrollo de la neoplasia.

La tendencia a la disminución de expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase I fue general en los casos analizados, pero mucho más evidente en los casos positivos para DNA de HPV; se sabe que existen algunos virus capaces de alterar la expresión de MHC por diferentes mecanismos, incluyendo, la producción de proteínas que interfieren con la generación de MHC funcionales como parte importante de los mecanismos de evasión del reconocimiento inmune. Para el HPV, estos mecanismos no están completamente estudiados pero la consecuencia final es la misma; una disminución en MHC I, lo cual podría ser un factor crítico de progresión por falta de generación de células T citotóxicas capaces de controlar el crecimiento tumoral.

La expresión de moléculas de clase II en muestras HPV positivas es variable y algunas veces focal; su significado no es muy claro pero se sabe que esta influenciando de alguna manera la progresión de la enfermedad y se relaciona con la agresividad tumoral.

El déficit de vitamina A, reflejado en los bajos niveles de PTR en el suero de los pacientes es importante, pues los retinoides son potentes moduladores de la diferenciación epitelial y carcinogénesis y tienden a suprimir el efecto transformante de carcinogenos físicos, químicos y virales en epitelio aerodigestivo, siendo útiles a nivel quimiopreventivo. Es de anotar que en los casos positivos para DNA de HPV, los niveles de PTR no fueron los más reducidos, lo cual podría indicar que en este grupo de pacientes con infección viral, no es necesaria la deficiencia de vitamina A para la progresión de la enfermedad.

El manejo de pacientes con Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral desde el punto de vista de seguimiento y tratamiento podría mejorarse si se tienen en cuenta estos factores y la importancia de una historia natural distinta relacionada con un agente infeccioso como el VPH.

EXPRESION DE ANTIGENOS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD, NIVELES DE PROTEINA TRANSPORTADORA DE RETINOL Y PRESENCIA DE PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE CAVIDAD ORAL

GENERALIDADES :

Los procesos malignos de cavidad oral han sido definidos y caracterizados con frecuencia como desórdenes neoplásicos del epitelio de revestimiento de la boca, incluyendo lengua, labios y orofaringe.

Este es un cáncer humano común, con una incidencia global de 500.000 casos por año (Parjin 1988, Vokes et al 1993). A pesar de varias intervenciones terapéuticas, incluyendo cirugías, radioterapia y quimioterapia, las tasas de supervivencia a 5 años de esta enfermedad han mejorado sólo marginalmente durante las pasadas dos décadas.

Los pacientes con enfermedad de cavidad oral cuyo tratamiento fracasa, presentan recurrencia de la enfermedad primaria (local, regional o distante) y desarrollo de segundos tumores primarios. Estos últimos ocurren en un 4-7% por año en sobrevivientes de largo término, no siendo influenciados por el estadio de la enfermedad (Dong 1996) .

En este país las malignidades de cavidad oral representan hasta el 3% de todos los casos nuevos diagnosticados en nuestra institución en los últimos 5 años, ocupando el noveno lugar en cuanto a incidencia.

El proceso de evolución del carcinoma escamocelular de cavidad oral comprende una serie de alteraciones del desarrollo celular desde una etapa premaligna, la cual puede ser reversible o alcanzar un estadio maligno.

La localización más frecuente es a nivel del tercio medio y posterior de la lengua, observándose en menor proporción, en otras áreas de la mucosa oral (Batsakis et al 1987).

Las lesiones premalignas o neoplasias intraepiteliales generalmente se originan como un foco clonal a nivel de la membrana basal, caracterizado por cambios morfológicos en las células que lo originan. Estos cambios se distribuyen ascendente y lateralmente hasta invadir el epitelio e incluyen incremento en el tamaño del núcleo, alteración de la morfología, presencia de mitosis anormales, desórdenes o ausencia de maduración e hiperchromatismo (Boone 1992).

Se consideran lesiones orales precancerosas las eritroplasias y leucoplasias. Estas últimas se definen clínicamente como lesiones blancas de la mucosa bucal. Microscópicamente se conocen tres formas de leucoplasia oral: (i) la forma plana o simple, (ii) la papilar endofítica y (iii) la papilar exofítica; las dos últimas corresponden a la forma verrugosa y erosiva. La atipia celular y el tejido displásico son frecuentemente hallados en el tipo endofítico papilar, en tanto que en la plana o simple hay hiperplasia o hiperqueratosis sin displasia. Otro tipo de lesiones que pueden aparecer en la mucosa de la cavidad oral son placas rojas conocidas como eritroplasias, de localización frecuente a nivel de la mucosa alveolar, gingiva y piso de la boca. Esta lesión por sus características ha sido considerada como una forma asintomática de cáncer.

En cuanto al origen del carcinoma escamocelular y de las lesiones precancerosas orales se han descrito factores de riesgo como el tabaco; el alcohol (Steinberg BM, 1989); las infecciones de tipo viral con HPV, EBV; deficiencias vitamínicas, como la Vitamina A (Sani B.P et al 1995); la sensibilidad mutagénica y polisomías cromosómicas (Sinndh et al 1995, Cloose et al, 1992; Voraud et al, 1993; Blot et al, 1995; Boone et al, 1992).

MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD :

Un importante factor que puede afectar la capacidad del tumor de evadir la respuesta inmune es la modulación en la expresión de antígenos de histocompatibilidad humanos y moléculas de adhesión intercelular; estas moléculas juegan un papel importante en la regulación de la progresión del crecimiento maligno. Las anomalías en la expresión de moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC) tanto de clase I como de clase II, y las alteraciones en el grado de infiltración leucocitaria en lesiones precancerosas y carcinoma escamocelular de cavidad oral, han sido relacionadas con un pronóstico desfavorable (Horuchi et al, 1993).

La alteración de la expresión de moléculas de MHC de clase I han sido documentada en diferentes tumores humanos donde se ha observado pérdida de la expresión en el 19% de tumores laríngeos, 14% de carcinoma colorectal, 10% de carcinoma gástrico y 10% de melanoma maligno (Perez et al 1992). La implementación y uso de reactivos específicos contra alelos individuales del MHC clase I han incrementado estos porcentajes de detección de alteraciones (López et al 1989). En general, la pérdida de la expresión puede correlacionarse significativamente con la disminución en el grado de diferenciación tumoral y por ende con el pronóstico de la enfermedad.

Las moléculas del MHC de clase II como las -DR, no están expresadas normalmente en epitelios, pero pueden aparecer en varias condiciones inflamatorias presumiblemente después de la inducción por citoquinas secretadas

por células T activadas infiltrantes y otros leucocitos, lo cual hace difícil la interpretación de las variaciones encontradas en el análisis inmunohistoquímico de los tumores. Más aún, la expresión de -DR en lesiones premalignas y malignas es considerada más compleja y el significado biológico de sus cambios durante el desarrollo tumoral aun no se conoce claramente (Glew et al 1992).

Por otra parte, desde hace varios años se conoce que como mecanismos de evasión, los virus pueden manipular no solo la carga del MHC sino también la síntesis, ensamblaje y expresión de glicoproteínas en la superficie celular que señalan la presencia de células infectadas por virus al sistema inmune (Maudsley et al 1991, Hill 1995).

En los casos de infección viral, particularmente los virus DNA de doble cadena como el HPV, el mRNA viral es traducido usando la maquinaria normal de la célula; los productos citoplasmáticos del genoma viral son degradados por proteasas celulares, entre estas las presentes en un complejo llamado proteosoma (Coux et al 1996). La degradación de las proteínas virales en el citoplasma lleva a la formación de péptidos que pueden ser transportados al interior del retículo endoplasmático por un complejo transportador que comprende los productos de los genes *tap1* y *tap2*. Tap se encarga del transporte asociado con presentación de antígenos (Heemels 1995). En el retículo endoplásmico este péptido se ensambla con la cadena pesada del MHC unida a la membrana y la cadena liviana, β -2m. La unión del péptido estabiliza la interacción de las cadenas y resulta un complejo trimolecular. El MHC cargado con el péptido es llevado por el retículo endoplasmático, a través del aparato de Golgi a la membrana celular (Jorgensen et al 1992, Bogger 1990), lográndose de esta manera hacer la presentación a los diferentes subtipos de células T con receptor para el antígeno específico del péptido en cuestión.

Existen diferentes modelos donde se han estudiado los efectos de algunos virus en la expresión de moléculas de histocompatibilidad (Wiertz et al 1997). Varios son los mecanismos de evasión de la respuesta que los virus pueden inducir alterando este proceso; el virus Herpes simplex codifica por ejemplo una proteína citoplasmática de 9 kDa, la ICP47, que interfiere con la generación de péptidos ó con la función de TAP, de tal manera que las moléculas del MHC son sintetizadas normalmente pero retenidas en el retículo endoplasmático, generando una resistencia a la lisis por linfocitos T citotóxicos (LTC) en las células infectadas (York et al 1994, Heemels et al 1993).

En el caso de la infección por citomegalovirus (CMV), existe una rápida disminución en la expresión de superficie de MHC I; las cadenas pesadas solo no son retenidas en el retículo endoplasmático, sino que son degradadas poco después de la síntesis. Existen dos genes involucrados, el *us2*, y *us1*, cada uno es suficiente para inducir degradación de moléculas del MHC clase I. Además,

CMV codifica una proteína UL18 que tiene homología con MHC clase I. Cuando UL18 es co-expresada con β -2m, las moléculas asociadas y el complejo resultante son transportados a la superficie celular, lo que sugiere que UL18 secuestra β -2m previniendo la formación del complejo cadena pesada- β -2m. (Jones et al 1995, Wiertz et al 1996, Browne et al 1992).

EL virus de Epstein Barr expresa un antígeno llamado EBNA 1 contra el cual no se monta respuesta inmune, pues parece que este tiene un epítotope que puede unirse con el MHC clase I o alternativamente puede que este epítotope no sea eficientemente generado para el procesamiento del antígeno y maquinaria de presentación (Khanna R et al 1992, Chen F et al 1995).

El gen *E1a* de Adenovirus tipo 12 reduce la expresión del MHC clase I por interferir con la transcripción de genes de clase I. La expresión de TAP además esta reducida por este mecanismo (Rotem et al 1994). La expresión del MHC es regulada por una serie de proteínas, entre ellas el complejo NF κ B, la cual se une a un elemento promotor en el MHC clase I, La E1b inhibe el procesamiento de precursores de NF κ B y consecuentemente reduce los niveles de estos dos activadores de transcripción (Schouten et al 1995).

Para el HPV, estos mecanismos de evasión no están completamente estudiados, pero se supone que al usar uno o más de estos, la consecuencia final es una disminución en la expresión adecuada del CMH y/o del péptido que se presenta a los linfocitos T citotóxicos (CTL).

HPV Y ONCOGENESIS :

Varios estudios han permitido relacionar la presencia de algunos tipos de HPV tanto en leucoplasias como en carcinomas escamocelulares conduciendo esto a una asociación del virus con el desarrollo y progresión del carcinoma (Snijders et al, 1994 ; Brandsma et al, 1989 ; Brachman et al, 1992).

El HPV ha sido detectado por hibridización *in situ* en un rango de 0-24% de SSC de cavidad oral, por Southern blot en el 12-70% y por PCR en el 0-100% (Kashima et al 1990 ; Yeudall et al 1991 ; Woods et al 1993). El HPV también se ha detectado en el 62.5% de leucoplasia verrugosa, 50% de eritroleucoplasias y 12% de Leucoplasia nodular ; en otro estudio, la tasa de detección en lesiones premalignas fue del 40.8% y negativo en grupos controles (Steinberg B.M et al 1996). Generalmente, el tipo más frecuentemente observado es el HPV 16 seguido del HPV18 y otros tipos como HPV 6b presentes en laringe y faringe ; también, han sido observados en una frecuencia similar los tipos 31, 33 y 35 (Kashima et al, 1990 ; Woods et al, 1993).

Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV, en particular de los tipos de alto riesgo como 16 y 18, estimulan la proliferación celular por activación de ciclinas E y A e interfieren con las funciones de las proteínas celulares Rb y p53 ; esta última es una fosfoproteína nuclear que regula apoptosis y juega un papel fundamental en la reparación de daño del DNA. La mutación en el gen p53 se han encontrado como la anomalía genética mas frecuentes presentes en la mayoría de neoplasias de adultos (Couturier et al 1990). En el caso de la oncogénesis para HPV, la interacción p53-E6 aparentemente es responsable de actividades mutagénicas y aneuploidias (Kern et al 1991). En regiones de cavidad oral, las mutaciones en este gen se han identificado en líneas celulares derivadas de carcinoma escamocelular de cavidad oral así como en tumores primarios. Además, la sobreexpresión de la proteína detectada por inmunohistoquímica, que es un indicativo de mutación, esta presente en el 54-67% de los cánceres orales (Dong M et al 1996). Existe la hipótesis de que en los casos negativos para HPV, la expresión inadecuada de p53 es debida a mutaciones, mientras que en los casos positivos, la alteración en la función de p53 se da por la interacción con E6 que lleva a una degradación acelerada de la proteína la que de otra forma, al igual que el gen, es completamente normal.

VITAMINA A Y CANCER :

Un aspecto importante que puede influir en la interacción del virus con el huésped es la presencia de niveles adecuados de Vitamina A (Ross et al 1996). La respuesta inicial del huésped ante una infección viral, está dada particularmente por la producción de citoquinas de la familia del interferon al sitio de infección inicial y la actividad citotóxica de los linfocitos NK (Ross et al 1996).

Luego de la respuesta inicial, se desarrolla una respuesta inmune específica contra proteínas virales que incluye la producción de anticuerpos y mecanismos efectores mediados por células. Experimentos hechos por Nauss y Newherne demuestran reducción de citotoxicidad de células NK en linfocitos de bazo de ratas deficientes de vitamina A infectadas con HSV, la cual se restaura con tratamiento con retinol y ácido retinoico (Nauss y Newherne 1995). Un posible mecanismo de la disminución de la respuesta a virus y otros agentes infecciosos en animales deficientes de vitamina A, puede relacionarse con el impedimento en la producción y maduración de células NK suprimiendo la acción citolítica y resultando en una posible reducción de citoquinas que participan en la regulación de la respuesta de humoral antígeno-específica.(Ross et al 1996).

Los metabolitos de la vitamina A promueven diferenciación de células epiteliales en el tracto respiratorio ; el modelo mejor caracterizado para la interacción de la vitamina A e infecciones vírales es la infección por el virus Newcastle en pollos ; este es un virus sincitial respiratorio que se transmite por vía aérea. Se especula que el retrasó en maduración epitelial en animales deficientes de vitamina A hace

que se den altos niveles de replicación viral ya que el epitelio inmaduro puede expresar enzimas como tripsina que es necesaria para el clivaje de la proteína Fo del virión ndv y así producir la infección, de tal manera que el epitelio columnar es incapaz de regenerarse remplazándose por un epitelio escamoso queratinizante (Alexander et al 1991).

Los estudios sobre deficiencia de vitamina A en el humano, muestran que el número total de linfocitos T y B disminuye en sangre periférica así como en órganos linfoides primarios y secundarios, sugiriendo un efecto directo de los niveles de vitamina A sobre la replicación viral y la respuesta inmune contra el virus (Sommer.A etal. 1995, Sijtsma.S.R etal 1991,Davis.C 1992, West etal 1992)

El tratamiento con β -all trans-ácido retinoico (ATRA) de queratinocitos epidermales humanos normales, durante o inmediatamente después de la transfección con HPV 16, inhiben el efecto de inmortalización en un 95%. Cuando células inmortalizadas con HPV-16 se tratan con ATRA, su crecimiento es suprimido y la expresión de oncogenes E6 y E7 de HPV-16, así como los marcos de lectura E2 y E7 se suprimen (Creek et al 1994).

En un modelo de displasia severa (NIC III), (células con HPV-16 en cultivo organotípico), ATRA previene la formación de epitelio similar a NIC III y suprime la expresión de citoqueratinas asociadas a lesiones premalignas, produciendo epitelios similares a los normales (Shindoh 1995).

Muchas neoplasias se desarrollan como resultado de la exposición a carcinógenos y agentes promotores ; la exposición a estas sustancias llevan a cambios histológicos sobre grandes áreas del tejido (piel o tracto aerodigestivo) resultando en una cancerización de campo con lesiones no sincronicas potencialmente premalignas y malignas, lo cual explica las altas tasas de recurrencia que siguen a la resección de ciertos cánceres en estado temprano y el desarrollo de segundos tumores primarios.

La administración tópica o sistémica de vitamina A, en la dieta o intragastricamente, antes o después de la exposición a un carcinógeno y/o a un agente promotor de tumor, han demostrado actividad anti-promotora. Estudios donde animales control desarrollan múltiples tumores asincrónicamente, la administración de retinoides luego de la aparición del tumor primario ha demostrado la supresión del desarrollo de segundos tumores primarios y un tratamiento continuo es efectivo para alcanzar supresión de carcinogénesis a largo plazo. Estas estrategias de quimioprevención apuntan a pacientes con riesgo de desarrollar cáncer como son los pacientes que tienen lesiones premalignas ó quienes tienen un cáncer diagnosticado en forma temprana, tratados pero con riesgo de desarrollar segundos tumores primarios. Los pacientes con lesiones premalignas múltiples o extensas donde la cirugía no es

una buena opción, son candidatos a quimioprevención con 13-CRA. (Hong et al 1994).

Este nuevo acercamiento al control del cáncer incluye tratamientos dirigidos al epitelio; la quimioprevención con agentes sistémicos es una de las estrategias utilizadas actualmente y los retinoides son uno de los agentes más usados. La deficiencia de vitamina A en animales experimentales se ha asociado con una alta incidencia e incremento de susceptibilidad a carcinógenos químicos (Moon et al 1994). Esta observación ha llevado a la hipótesis de que niveles fisiológicos de retinoides protegen el organismo contra el desarrollo de lesiones malignas y premalignas. Los modelos experimentales de carcinogénesis han demostrado la eficiencia de niveles farmacológicos de retinoides en prevenir el desarrollo de cáncer de piel, cavidad oral, pulmón, glándula mamaria, próstata, vejiga, hígado y páncreas en animales expuestos a agentes carcinogénicos (Moon et al 1994).

Este es un reporte preliminar donde se pretende por medio del estudio de varios aspectos inmunológicos y moleculares, entender un poco más la biología e historia natural del Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, con miras a aportar nuevos conceptos en cuanto al manejo, pronóstico, seguimiento y tratamiento del paciente oncológico.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes :

Fueron recolectadas las muestras provenientes de 10 casos de carcinoma escamocelular de cavidad oral de pacientes que ingresaron por primera vez a la consulta de Cabeza y Cuello de nuestro instituto. Dentro de la historia clínica, se analizaron aspectos como consumo de tabaco, alcohol, tiempo de evolución de las lesiones y presencia de lesiones premalignas. Como controles, se tomaron muestras tejidos blandos de cavidad oral de pacientes sin historia de cáncer ni infecciones por HPV.

A partir de las biopsias frescas congeladas, se realizaron cortes en crióstato para el análisis histopatológico de las lesiones, expresión de moléculas de histocompatibilidad y extracción de DNA para evaluar la infección por HPV.

Por otro lado, se tomaron muestras de suero de los pacientes con el fin de evaluar la respuesta inmune contra diferentes proteínas del virus y también para determinar los niveles de proteína transportadora de Retinol en estos pacientes.

Inmunohistoquímica :

Los cortes de tejidos se fijaron por 5 minutos en acetona fría ; posteriormente se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS. Los anticuerpos utilizados, provenían de sobrenadantes obtenidos en el laboratorio a partir de hibridomas de la American Type Culture Collection (ATCC). Para los antígenos HLA-I, se empleó el anticuerpo W6/32 que reconoce el complejo HLA-A,B,C- β 2- microglobulina (Homna et al 1989) , para HLA-II; el anticuerpo L243 dirigido contra el determinante monomórfico DR (Gutierrez 1990) y para el antígeno de función leucocitario (LFA3), el anticuerpo anti CD58/LFA3 (Goebels et al 1992).

La detección se realizó mediante la técnica de inmunoperoxidasa (Vectastain ABC Kit ; Funakoshi, Tokyo, Japón) y se visualizó empleando una solución de Diaminobenzidina (0.5mg/ml) más H_2O_2 0.03% ; como colorante de contraste se utilizó Hematoxilina. La lectura se realizó sobre tejido tumoral y normal se valoró semicuantitativamente la expresión según la intensidad de la coloración.

Detección de HPV por PCR :

La detección de HPV fue realizada a partir DNA extraído de los cortes de tejido fresco congelado, utilizando la PCR según el sistema de Walboomers et al 1995 (iniciadores biotinados GP5+/GP6+). Estos iniciadores amplifican un fragmento de 150 pb correspondiente a la región L1 de al menos 23 tipos diferentes de HPV.

La PCR fue realizada en 40 ciclos en un procesador Perkin-Elmer 9600. Cada ciclo involucra un paso de denaturación de 1 minuto a 94°C, un paso de anillamiento de 1.5 minutos a 40°C y finalmente un paso de elongación de 1.5 minutos a 72°C. El primer paso fue precedido por un paso de denaturación de 4 minutos y el último paso fue seguido por uno de elongación de 4 minutos. Como control positivo se utilizó DNA de las líneas celulares SiHa y HeLa (100 pg y 10 pg respectivamente); como control negativo, el DNA extraído de cortes de tiroides humana. Los productos de PCR fueron analizados por southern blot, realizando una transferencia a filtros de nylon cargados positivamente (Boehringer) por difusión en NaOH 0,5N y NaCl 0,6N. La detección de genérica de los amplímeros fue realizada por Southern Blot usando el método de Walboomers 1995.

La detección tipo específica fue realizada mediante un inmunoensayo en fase sólida (EIA) siguiendo la metodología de Jacobs 1995. En breve, los productos de amplificación marcados con biotina a partir de los iniciadores GP5+/GP6+, fueron adicionados a microplacas (NUNC) cubiertas con estreptavidina; luego de su fijación y denaturación, fueron adicionadas oligosondas de HPV 11,16 y 18 marcadas con digoxigenina a una concentración de 2 pm, 5 pm y 2.5 pm respectivamente. Los híbridos fueron detectados adicionando el anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina. La reacción se reveló adicionando pNPP como sustrato. La intensidad del color fue medida a 405/620 nm en un lector de ELISA Labsystems MCC/340. El punto de corte para cada uno de los ensayos de detección para DNA de HPV 16 y 18 fue de 0.267 y 0.282 respectivamente, obtenidos a partir de los resultados de la media multiplicada por 3, correspondiente a 17 casos de controles normales, negativos para HPV por PCR genérica.

Niveles de Proteína Transportadora de Retinol :

Los niveles de PTR fueron medidos por ELISA en sandwich utilizando el Kit UBI-MAGIWEL. En este ensayo, cada pozo de la microplaca está cubierto con un anticuerpo anti-PTR; cada pozo se incubó con los estándares de 5, 10, 20, 50 y 100 ng/ml de PTR y con los sueros de los pacientes en una dilución 1/1000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó una segunda incubación con el conjugado anti-PTR marcado con peroxidasa por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se adicionó el sustrato; tetrametilbencidina más H₂O₂ por 10 minutos, y la reacción se frenó con H₂SO₄ 1N.

La lectura se realizó a 450nm en un lector de ELISA Labsystems MCC/340. La intensidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de RBP en los sueros. Los valores fueron calculados en mg/dl, a partir de la curva de calibración.

Como controles se utilizaron 10 sueros de personas de la población normal con edades similares a la población de estudio los cuales no presentaban ninguna lesión a nivel de cavidad oral.

Detección de Anticuerpos Anti-HPV :

Los anticuerpos anti- E7 /HPV fueron detectados por ELISA siguiendo el método estandarizado por Cómbita (1995) En breve, las microplacas de titulación (NUNC-maxisorp) fueron acopladas con 100 ul de proteínas recombinantes : MBP-E7/HPV 11,16,18 a una concentración de 2 ug/ml, toda la noche a 4°C ; El exceso de antígeno fue removido y los sitios no específicos fueron bloqueados con BSA 3% en PBS por 2 horas a 37°C. Después de 5 lavados, 100ul del suero de los pacientes fueron adicionados en una dilución 1/50 e incubados por 1 hora a 37°C. Luego se adicionaron 100ul del conjugado anti-IgG humano marcado con peroxidasa diluido en PBS-BSA 3% por 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas 3 veces y la reacción se reveló con 100ul del sustrato para peroxidasa, ABTS 0.1% en buffer citrato-fosfato 50mM pH 5.0 más H₂O₂ 0.03%. La intensidad del color fue medida a 405 nm en un lector de ELISA Labsystems MCC/340.

Para cada antígeno el valor del punto de corte fue calculado con la absorbancia media más 3DS obtenida a partir de los sueros del grupo control normal. En este caso el punto de corte para anti E7 de HPV16 y anti.-E7 de HPV 18 fue de 0.309 y 0.373 respectivamente.

RESULTADOS

De los 10 casos analizados, 5 correspondieron a hombres y 5 a mujeres, todos ellos con diagnóstico histopatológico de Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral. La distribución por edades se presenta en la figura 1, donde se puede observar cierto predominio de pacientes mayores de 50 años.

En cuanto al tiempo de evolución, 3 de los pacientes presentaban lesiones con una evolución superior a un año y 3 de ellos presentaban además lesiones premalignas concomitantes.

Se detectaron factores de riesgo como el consumo de tabaco y Alcohol por periodos superiores a un año, en 5 y 3 de los pacientes respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1 : Características de pacientes con carcinoma escamocelular de cavidad oral.

CASO	SEXO	EDAD	TABACO	AÑOS	ALCOHOL	AÑOS	EVOLUCION	LEUCOPLASIA
1	F	24	0	0	0	0	4	SI
2	M	60	40	4	1	30	8	NO
3	M	70	20	50	3	50	4	NO
4	F	53	20	45	0	0	4	NO
5	F	68	0	0	0	0	4	NO
6	M	67	40	10	6	22	5	SI
7	M	73	40	20	0	0	36	NO
8	F	19	0	0	0	0	8	NO
9	M	23	0	0	0	0	14	NO
10	F	37	0	0	0	0	18	NO

F : Femenino
M : Masculino

TABACO : Cigarrillos / día
ALCOHOL : Botellas / semana

EVOLUCION : meses

En todos los casos analizados, el patrón inmunohistoquímico mostró una expresión muy variada de los antígenos HLA I, HLA II y LFA3 en células tumorales, pero en general se notó una disminución de las moléculas de clase I (comparada con los tejidos normales) sobre todo en los dos casos positivos para HPV. En cuanto a la moléculas de clase II se notó una expresión moderada al igual que para LFA3. (Tabla 2).

En los controles normales provenientes de tejidos blandos de cavidad oral se encontró una alta expresión de MHC de clase I y fue negativo para DR y LFA3, como podría esperarse.

En la prueba de PCR de detección genérica, sólo dos muestras fueron positivas para DNA de virus de papiloma humano ; una de ellas fue positiva con las sondas para HPV 6/11 y en la otra muestra no se logró determinar el tipo viral con las sondas disponibles. Con respecto a la detección de anticuerpos anti HPV , todas las muestras fueron negativas en ELISA con las proteínas utilizadas como antígeno (Tabla 2).

En la determinación de niveles de proteína transportadora de Retinol, se evidenció en general niveles significativamente bajos en los casos con respecto a los controles ($p= 0.01$) (Tabla 2).

Tabla 2: Analisis de : DNA para HPV tipo especifica, anticuerpos anti-HPV-11, -16, -18, inmunohistoquímica y concentraciones para PTR.

CASO	PCR HPV	Anti-HPV			IHQ			[]
		11	16	18	HLAI	HLAII	LFA3	PTR
1	-	-	-	-	+	+/-	-	5
2	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	9
3	-	-	-	-	+/-	-	-	6.4
4	-	-	-	-	+/-	-	-	8.4
5	HPVX	-	-	-	-	-	-	11
6	-	-	-	-	+/-	-	-	8.1
7	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	14
8	16	-	-	-	-	+/-	+/-	10
9	-	-	-	-	+/-	-	-	7.1
10	-	-	-	-	+/-	+	+/-	9

DISCUSION

En el Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, el uso de carcinógenos como el humo del tabaco y el consumo de alcohol, son factores de riesgo comúnmente asociados a esta patología y parece ser que se relaciona con un porcentaje importante de casos (Baron et al 1993). Sin embargo, no todos los individuos expuestos desarrollan esta patología, por lo que una susceptibilidad intrínseca ha sido sugerida como factor importante en el desarrollo de carcinogénesis (Li et al 1994). En este trabajo se encontró que 5 de los pacientes consumían tabaco y 3 alcohol por más de un año, lo cual ratifica que si existe relación en cuanto a estos hábitos y el riesgo de desarrollar esta patología, pues el metabolismo del etanol (aunque no se considera un carcinógeno) puede temporalmente inhibir la capacidad de reparación del DNA y ha mostrado ser capaz de incrementar la producción de radicales libres y altos niveles de oxidantes se presentan tanto en el consumo de este como en el de tabaco (Hsv et al 1991).

La distribución por edades fue similar a la encontrada en varias series, donde la mayoría de pacientes presentan edad avanzada, lo cual es coincidente con la historia natural pues es el comportamiento normal en este tipo de neoplasias (Nielsen et al 1996).

La distribución por sexo fue igual tanto para hombres como para mujeres; la localización predominante fue a nivel de lengua, seguido por labio, amígdala y piso de la boca. Con respecto al tiempo de evolución de las lesiones, 3 tenían una evolución de más de un año y los restantes de 4 a 10 meses. Sólo se encontraron lesiones premalignas concomitantes en 3 casos.

Los virus de papiloma humano (HPV) son un grupo de virus epiteliotrópicos cuyo DNA genómico presenta homología entre sí, sin embargo solo los tipos de alto riesgo (16,18) son involucrados en transformación maligna; las oncoproteínas E6 y E7 de los tipos de alto riesgo se unen a proteínas celulares que tienen propiedades de genes supresores tumorales: la oncoproteína E7 de HPV16 se une a al producto del gen de retinoblastoma (pRb) (Dyson et al 1989) y la oncoproteína E6 de HPV16 y 18 se une a la proteína p53 (Huibregtse et al 1991, Scheffner et al 1990).

En este trabajo encontramos DNA de HPV en 2 de los casos, los que correspondían a mujeres; uno de los cuales fue positivo HPV 16 y el otro no se logró determinar con las sondas disponibles; ninguno de los sueros presentó reacción positiva de anticuerpos al ser probado con las proteínas de fusión E7 de los tipos 11,16 y 18.

Los hallazgos de DNA de HPV en 2 de las muestras, sin exposición aparente a otros factores de riesgo asociados frecuentemente con esta neoplasia como

alcohol o tabaco, sugieren que estos puede representar un pequeño grupo de pacientes con carcinoma escamocelular de cavidad oral en el cual el HPV juega un papel central en el desarrollo de la patología (Crook et al 1992). Esta asociación ya ha sido demostrada en varios estudios ; en Taiwan Chang et al 1989, analizaron 17 muestras de Ca de cavidad oral, encontrando un 76.4% de muestras positivas para HPV-16 contra un 5.9% de los controles de tejido gingival normal ; Brandsma y Abramson en 1989, estudiaron presencia de HPV en 21 casos de Ca de lengua, encontrando 2 casos positivos ; Madem et al 1992, a partir de células exfoliativas de 131 casos de cáncer oral encontraron 19% de positividad para HPV-6. ; Snijders et al 1992 por PCR e ISH analizaron 10 casos de carcinoma de amígdala encontrando 100% de positividad para DNA HPV (16,33 y 40).

La expresión de moléculas de histocompatibilidad fue muy variada, pero a pesar de esto se puede notar una tendencia a la disminución de MHC de clase I en células tumorales en los casos positivos para HPV y en general en la mayoría de casos, lo cual se puede explicar por múltiples mecanismos ; la existencia de mutaciones y/o deleciones en las regiones codificadoras de genes estructurales de la cadena pesada ; solo dos mutaciones acumulativas en los genes de β -2 microglobulina pueden ser suficientes para inducir completa pérdida de moléculas de clase I (Viac et al 1990). Muchos estudios demuestran que aparentemente no hay alteraciones en los genes de MHC -A, -B o -C (Cromme et al 1993), pero los genes de la cadena pesada y β -2 microglobulina son frecuentemente afectados (Hilders et al 1994).

El anticuerpo W6/32 reconoce el complejo MHC-A, -B ó -C, β 2-microglubulina, por lo tanto una alteración a nivel de alguno de ellos basta para que el anticuerpo no pueda reconocer la molécula ; haría falta utilizar otros anticuerpos alelo específicos para determinar en detalle donde se encuentra la alteración que se refleja en una baja expresión de MHC clase I.

También se ha documentado que existe una asociación directa entre la expresión de superficie celular y los niveles de mRNA de MHC clase I, sugiriendo una regulación transcripcional de su expresión (Ruiz et al 1991, Doyle et al 1985, Esteban et al. 1985, Blanchet et al 1991).

Algunos virus pueden modular la expresión de estas moléculas y modificar la respuesta de CLT, independientemente de la producción endógena de interferon gamma. El virus de sarcoma de Rous reduce expresión de MHC clase I en fibroblastos humanos infectados (Gogusev et 1988), por el contrario el virus Epstein-Bar, paramixovirus y Flavovirus han sido asociados con un incremento en la expresión de MHC I (Jilg et al 1991).

Las moléculas de clase II son glicoproteínas que sirven como elementos de restricción para el reconocimiento de péptidos antigénicos por LT CD4 positivos (Scheherazade et al 1992). La expresión de estas moléculas en la superficie de células neoplásicas de diferentes orígenes ha sido documentada (Zaloudik et al 1988, Zuk and Walker, 1987) y una variedad de mecanismos se han postulado como inductores. Las citoquinas inflamatorias como IFN γ y TNF son capaces de inducir expresión de HLA-DR en una variedad de tipos celulares humanos (Nickoloff et al 1990), lo cual ha llevado a la hipótesis de que la expresión de estas moléculas son más el resultado de una inducción que no un efecto constitutivo de la transformación neoplásica *per se*. La moderada expresión de HLA-DR en los casos analizados que son normalmente negativos para esta molécula, no indican necesariamente una respuesta efectiva de parte del huésped contra el tumor; su significado biológico no es muy claro y parece ser mucho más complejo de entender que el de las variaciones de las moléculas del MHC clase I (Stamley et al 1994).

En este como en otros trabajos la baja expresión de las MHC clase I se ha observado tanto en lesiones HPV positivas como negativas, lo cual significaría que existen dos grupos, uno con infecciones por HPV y el otro con factores no bien definidos, que tendría la misma acción de disminución de MHC clase I, que al final llevaría a un pobre reconocimiento inmune e incapacidad de controlar el crecimiento tumoral.

En varios trabajos se han demostrado que en una serie de tumores la pérdida de estas moléculas es de forma post-transcripcional (Crome et al 1993). En los tumores HPV 16 y 18 positivos esta pérdida post-transcripcional de MHC clase I es relacionado con los desordenes en el transporte de péptidos debido a una baja expresión o regulación del gen que codifica para las proteínas TAP-1; esta es una importante observación, pero es poco probable que todas las disminuciones de MHC clase I sean debidas a este mecanismo (Connor, Stern 1990). Por otro lado se ha observado que la pérdida de β -2 microglobulina está además acompañada por ausencia de cadenas pesadas y esto sugiere que la regulación de productos de los genes del MHC juega un papel importante, pues interfiere con el reconocimiento de células T a su blanco (Connor and Stern 1990).

De acuerdo a lo observado en los resultados, la expresión de MHC clase II en células infectadas con HPV es variable y algunas veces focal: Glew et al postuló que esta expresión es reflejo de la transformación neoplásica (Glew et al 1992). Pero una explicación alternativa es que esta expresión de MHC clase II es en más el producto de inducción por citoquinas que una expresión constitutiva de las células neoplásicas (Coleman and Stanley 1994).

La expresión de CD58 detectado con el anticuerpo monoclonal LFA3, nos permite evaluar la presencia del infiltrado linfoide, y su positividad podría interpretarse

como el reflejo de una respuesta inmune adecuada. Sin embargo, la expresión de este antígeno no fue observada en ninguno de los casos, como se muestra en la tabla 2.

Cambios en este tipo de moléculas están influenciando de alguna manera la progresión de la enfermedad y se relacionan estrechamente con la agresividad del tumor, pues son mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales y podrían explicar de alguna manera la ausencia de anticuerpos anti-HPV en los casos positivos para el virus (Gavioli et al 1993).

La proteína transportadora de retinol (PTR) es la encargada de llevar la vitamina A a los tejidos y sus niveles séricos son proporcionales a las concentraciones de retinol disponibles en el organismo. Existen muchas evidencias que sugieren que aspectos del transporte y metabolismo del retinol se alteran durante infección viral o inflamación experimental, pues hay un efecto significativo en su síntesis hepática y secreción (Ross et al 1996).

En el presente estudio se demostró que en general, los pacientes presentaron niveles bajos de PTR al ser comparados con un grupo control, diferencia que fue estadísticamente significativa y que refleja una deficiencia vitamínica, lo cual pueden ser un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer de cavidad oral, se ha demostrado que los retinoides son potentes moduladores de diferenciación epitelial y carcinogénesis y tienden a suprimir el efecto transformante de carcinógenos físicos, químicos y virales en epitelio aerodigestivo, siendo útiles a nivel de quimioprevención en pacientes que tienen riesgo de recurrencia o de desarrollar un carcinoma escamocelular secundario de cabeza y cuello (Malcolm et al, 1992). No obstante hay que anotar que en los 2 casos positivos para DNA de HPV no se observan niveles séricos disminuidos de PTR, lo cual puede indicar que en este grupo de pacientes con infección viral no es necesaria la deficiencia de vitamina A para la progresión de la enfermedad.

La eficacia de los retinoides en la inhibición de carcinogénesis de cavidad oral se ha examinado en varios modelos: el DMBA induce carcinogénesis bucal en hamster similar a la carcinogénesis oral humana, donde lesiones premalignas (leucoplasias) preceden al desarrollo de carcinoma escamocelular (SCC) (Shklar et al 1980). La carcinogénesis de lengua inducida por DMBA en hamster y la carcinogénesis oral de célula escamosa inducida por el 1-óxido-4-nitroquinolina (Inoue et al 1993), se inhibe o retrasa por tratamiento con 13-*cis*-ácido Retinoico; la aparición de leucoplasia oral y la incidencia de carcinoma decrecen (Verma et al 1992, De Luca et al 1994).

También existen experimentos *in vitro* con linfocitos humanos que soportan el posible papel del ácido retinoico en la regulación de la respuesta dada por IL-2, que es el centro de la inmunidad mediada por células T, respuesta de anticuerpos

y activación de células NK, lo cual puede explicar, en parte, la alteración en el reconocimiento de antígenos tumorales que permiten la progresión de la enfermedad (Felli et al 1991).

Muchas evidencias indican que los retinoides actúan a nivel de promoción tumoral mejor que en la iniciación. El estado de promoción involucra expansión de la población de células iniciadas a forma preneoplásica y la conversión de esta a una población maligna. Este proceso se asocia con alteraciones en diferenciación y proliferación celular, así como la disminución de apoptosis (Lotan et al 1996). Los retinoides pueden inhibir la promoción, modulando la proliferación y aumentando la apoptosis y adicionalmente puede prevenir la conversión de un carcinoma *in situ* a uno invasivo por supresión de células premalignas, inhibiendo la angiogénesis (Lotan 1996).

Todas estas bases teóricas y nuestros hallazgos nos permiten concluir que existen, como en todos los procesos neoplásicos, múltiples factores involucrados en el desarrollo de esta patología, pero algo que definitivamente está jugando un papel fundamental es la parte nutricional. El manejo de estos pacientes desde el punto de vista de seguimiento y tratamiento podría mejorarse si se tienen en cuenta estos factores.

Para lograr tener conclusiones definitivas es fundamental contar con un número mayor de casos que nos permitan confirmar el planteamiento de la existencia de dos subgrupos dentro de esta población; uno donde la infección por HPV juega un papel preponderante en el proceso oncogénico, y su detección sería muy importante, pues al menos, parte de su manejo estaría orientado a reforzar y modular la respuesta inmune antiviral, de manera que contribuya al control de la neoplasia.

El otro subgrupo, serían los pacientes en los cuales la deficiencia de vitamina A juega un papel importante en el proceso oncogénico y de progresión tumoral, y la evaluación de sus concentraciones en suero por medio de un método sencillo y práctico, como el empleado en este trabajo, permitiría un manejo más adecuado de los mismos, que incluiría el uso de retinoides como tratamiento adyuvante, no solo para el control del tumor, sino para la prevención de recaídas o aparición de segundos primarios.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, D.J. Newcastle disease and other paramixovirus infection. In Diseases of poultry. 1991. 9th. Edc. Chap.19. pp 496-519.
2. Batsakis. et al. Pathology of tumor of the oral cavity comprehensive management of head and neck tumor. De. W.b. Saunders Company. Philadelphia 1987. Chapter 23. Pg 480-4563
3. Boone, C.,Kellof,G., Steele, V. Natural history of Intraepithelial neoplasia and chemoprevention strategy. Cancer Research. 52 : 1651-1659. 1992.
4. Braakhus, B.,Steen, I., Cooper, M. Increased mutagen sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma patients particulary Those with multiple primary tumors. Int. J. Of Cancer. 56 :816-819.
5. Brachman, D :G., Graves, D., Vokes, E., Beckett, M., Haraf, D., Montag, A., Duphy, E., Mick, R., Yandell, D. and Weichselbaum, R.R. Ocurrance of *p53* gene deletions and human papillomavirus infection in human head and neck cancer. Cancer Res. 1992 :52 :4832-4836.
6. Bransma, J.L. and Abramson, A.I. Association of papillomavirus with cancer of the Head and neck. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1989 :115 :621-625.
7. Browne, H et al. Contruccion and characterization of a human cytomegalovirus mutant with the UL18 (Class I homolog) gene deleted. J. Virol. 1992 : 66 :6784-6787.
8. Charles A. Eibling D, McCoy JP, Barnes L, Emanuel B, Fowler C, Wagner R, Johnson JT. Flow Cytometric Analysis of Primary and Metastatic Squamous Cell Carcinoma of The Oral Cavity and Oropharynx. Laryngoscope 105 ;Feb 1995
9. Charles W. Boone, Gary J. Kelloff, and Vernon E. Steele. Natural History of Intraepithelial Neoplaasia in Human with Implication for Cancer Chemoprevention Strategy. Cancer Research 52,abril 92.
10. Chen, F. et al. A subpopulation of normal B cell latently infected with Epstein-Bar virus resembles Burkitt Lymphoma cell in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP-1. J.Virol.1995 :69 :3752-3758.
11. Christian Buchwald, Maria-Benedicte Franzmann,Grete Krag Jacobsen,Henning Lindeberg. Human Papillomavirus and Normal Nasal Mucosa : Detection of Human Papillomavirus DNA in Normal Nasal Mucosa Biopsies by Polymerase Chain Reaction and In Situ Hibridization. Laryngoscope 104 : June 1994.
12. Courturier, J., Sastre-Garau, X., Shneider-Maunoury, S., Labib, A. and Orth, G. Integration of papillomavirus DNA near protooncogene expression. J. Virol.1990 :65 : 4534-4538.
13. Coux, O., Tanaka, K. And Goldberg,A.K. Structure and functions of the 20S and 26S proteosomes. Annu. Rev. Biochem. 1992 :65 :801-847
14. Creek , K.E., Jenkins, G.R., Khan, M.A., Batova, A. , Hodam, J.R., Tolleson, W.H. and Pirisi, L. Retinoic acid supresses human papillomavirus type 16 (HPV16)- mediated tranformation

of human keratinocytes and inhibits the expression of the HPV16 oncogenes. *Adv Exp.Med. Biol.*1994 :354 : :19-35.

15. David G. Brachman, Deborah Graves, Everett Vokes, Michael Beckett, Daniel Haraf, Antony Montag, Edward Dumphy, Rosemarie Mick, David Yandell and Ralph R. Weichselbaum. Advances in Brief. Occurrence of p53 Gene Deletions and Human Papilloma Virus Infection in Human Head and Neck Cance. *Cancer Research* 52 ;Sept.1992.
16. Davis, C.Y., and Sell, J.L. Inmunoglobuliin concentration in serum and tissues of vitamin A deficient broiler chicks after Newcastle disease virus vaccination. *Poultry Sci.* 1989 :68 :136-144.
17. Digweed, M. Human genetic instability syndrome single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicol. Lett.* 1993 :67 : 259-281.
18. Dong M. Shin, Jin S.Lee,Scott M. Lippman, J. Jack Lee,Z.Nora Tu, Geon Choi, Kirt Heyne, Hyung Ju C. Shin, Jae Y, Ro, Helmuth Goepfert, Waun Ki Hong, Walter N. Hittelman. P53 Expression :Predicting Recurrence and Second Primary Tumors in Head and Nexk Squamous Cell Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol.88, No. 8, April 17, 1996.
19. Esteban, F., Ruiz-Cabello, F., Concha, A. *Clin exp. Metast.* 1985 :8 :319-128.
20. Felli, M.P., Vacca, A.,Meco, D., Screpani, L., Fanira, A.R., M. Martinott, S., Petrangeli, E., Frati, L., and Gulino, A . Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-1 promoter via cis regulatory secuencias containing an octammer motif. *Mol. Cell. Biol.*1991 : 11 :4771-4778.
21. Gavioli. R et al. Recognition of Epstein-Bar virus cytotoxic T cellll apitopes using recombinant vaccinia. Implication for vaccine development. *J. Exp. Med.* 1992 : 176 :169-176.
22. Glew, S.S., Duggan-Keen., Cabrera, T., Stern, P.L. HLA Class II Antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res.* 1992 :52 :4009-4016.
23. Heemels, M.T. and Ploegh, H.L. Generation, translation and presentation of MHC Class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 1995 :64 :463-491.
24. Heelmels, M.T., Shumacher, T.N.M., Wonegert, K. And Ploegh, H. Different peptides are translocated by allelic variants of the transporter associated with antigen presentation (TAP). *Science.* 1993 :262 :2059-2063.
25. Hong, W.K and Itri, L.M. 1994 Retinoids and human cancer. In the Retinoids, 597-658. New York.
26. Horuchi, K., Mishima, K., Oshawa, M and Ozasa., K. . Pronostic factores for well-differentiated squamous cell carcinoma in the oral cavity with emphasis on immunohistochemical evaluations. *Journal of surgical oncology.* 1993 :53 :92-96.
27. Inoue,I.,Yamamoto, Y.,Ito, T., and Takahashi, H. Chemoprevention of tongue carcinogenesis in rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Phathol.*1993 :876 :608-615.

28. Jeffrey M. Ahn, Cheng-Chun Huang, Hyung T.Cho. Localization of Interleukin-1 Human Squamous Carcinomas of the head and Neck. *Laryngoscope* 103 : Mayo 1993
29. Jones, T.R et al. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* 1995 : 69 :480-4841.
30. Jorgensen, J.L ., Reay, P.A., Ehrich, E.W. and Davis, M.M. Molecular components of T-cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 1992 :10 :853-873.
31. Kashima, H.K., Kurtcher, M., Kesis, T., Levin, L.S., and Shah, K.V. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of the cavity oral. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1990 :99 : 55-61.
32. Kem, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. Identification of *p53* as a sequence-specific DNA binding protein. *Science* .1991 :252 :1708-1711.
33. Khanna, R. et al. Localization of Epstein-Bar virus cytotoxic T Cell epitopes using recombinant vaccinia : implication for vaccine development. *J. Exp. Med.* 1992 :176 :169-176.
34. Li, S.L. Kim, M.S. Doniar, J. Saquential combined tumorigenic effect of HPV-16 and chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 1994 : 13 : 1981-1987.
35. López-Nevot, M.A., Esteban, F., Ferrón, A., Gutierrez , J., Oliva, M.R., Romero, C., Huelin, C. and Garrido, F. HLA-Class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases : Demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinoma. *Brit. J. Cancer.* 1989 : 59 :221-226.
36. Maudsley, D.J. and Pound, J.D. Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol. Today.* 1991 :12 :429-431.
37. Moon, R., Mehta, R.C and Rao, K.J.V.N. Retinoids and cancer in experimental animals. In the retinoids . 1994 : 573-595.
38. Nauss, K.M.,and Newherme, P .M. Local and regional inmune function of vitamin A- deficient rats with ocular herpes simples virus (HSV) infections.*J Nutr.* 1985 :115 :1316-1324.
39. Pérez, Ayala, M., Redondo, M., Concha, A., Cabrera, T and Garrido, T. 1992. *Int. J. Cancer* (Suppl. 6) 123-130.
40. Radhakrihna Pillai, Prabha Balaran, Kannan Sankara Reddiar. Pathogenesis of Oral Submucous Fibrosis. *Cancer* ;69 ;8 ;1992.
41. Rockett J.C, Darnton S.J,Crocker J,Matthews H.R,Morris A.G. Expression of HLA-ABC, HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 in oesophageal carcinoma. *J Clin Pathol* ;48 ;1995.
42. Ross, A.B., and Hammerling, V. Retinoids and the inmune system. In the Retinoids. *Biology, Chemistry and Medicine.* 1994 :2nd . Edc. Pp 521-544.

43. Rotem- Yehudar , R et al. Downregulation of peptide transporter genes in cell lines transformed with highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp. Med.* 1994 :180 :477-488.
44. Ruiz- Cabello, F., Pérez -Ayala, M., Redondo, M., Concha, A., Cabrera, T., and Garrido, F. *Int. J. Cancer.* 1991 (Suppl 6) :123-130.
45. Satoshi Yasumara, Eckhart Weidmann, Hideki Hirabayashi, Jonas T. Johnson, Ronald B. Herberman and Theresa L. Whiteside. HLA Restriction and T-Cell Receptor V β Gene Expression of Cytotoxic T Lymphocytes Reactive With Human Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Int. J. Cancer* ;57, 1994.
46. Schouten, G.T., Van de E.B, A.J. and Zanema, A. Down regulation of MHC Class I expression due to interference with p105-NF κ B1 processing by Ad 12 E 1A. *EMBJ.* 1995 :14 :1498-1507.
47. Shindoh , M., Sun, Q., Pater, M.M. Prevention of carcinoma in situ of human papillomavirus type 16-inmortalized human endocervical cells by retinoic acid in organotypic raft culture. *Obstet. Gynecol.* 1985 :85 :721-728.
48. Shklar, G. Schawart, J., Grau, D., Trickler, D.P., and Wallace , K. Inhibition of hamster buccal punch carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. *Oral Surg.* 1980 :50 :45-52.
49. Sijtma, S.R., Rombout, J.H., Kiepurski, a., West, C.E. and Van der Zijpp, A.J. Changes in lymphoid organs and blood lymphocytes induced by vitamin A deficiency and Newcastle disease virus infection in chickens. *Dev Com. Immunol.* 1991 :15 :349-356.
50. Sinndh. Shaht, T., Hong, W.K, Hittelman, W.N. p53 Expression and genetic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Proc. Am . Assoc. Cancer Res.* 1994 ; 35 :944.
51. Snijders, P.J.F., Van der Brule, A :J :C : Meijer, C.J.L.M and Walboomers, J.M.M. Papillomavirus and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. *Cur Top. Microbiol. Immunol.* 1994 :186 : 177-198.
52. Sommer, A., Rahmathullah, L., Underwood, B. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia in developing countries. *Bull. World Health Org.* 1995 :73 :609-619.
53. Steinberg, B.M., Topp, W.C., Schneider , P.S and Abramson, A.L. 1983. Laryngeal papillomavirus infetion during clinical remission. *N. Engl. J. Med,* 308, 1261-1264.
54. Troels Bundgaard, F.B. Sorensen, M. Gaihede, H. Sogaard, J. Overgaard. Stereologic, Histopathologic, Flow Cytometric, and Clinical Parameters in the Prognostic Evaluation of 74 Patients With Intraoral Squamous Cell Carcinomas. *Cancer* ;70 ;No 1 ; Julio 1992.
55. Van Halten HK, Taal VG, Van Tinteren H and Van Leeuwen FE. Risk Factors for the Development of Oesophageal Cancer as a Second Primary Tumor. *Eur J Cancer,* Vol.31A, No. 11, 1995
56. Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman , S.M., Hong, W.K. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 1993 : 328 :184-194.

57. Volant A, Nousbaum JB, Giroux MA, Roué-Quintin I, Metges JP, Férec C, Gouérou H, Robaszkiewicz M. P53 Protein Accumulation in Oesophageal Squamous Cell Carcinomas and Precancerous Lesions. *J. Clin Pathol* ;48 ;1995.
58. West, C.E., Sijtsma, S.A., Kouwenhoven, B., Rombout, J.H. and Van del Zijpp., A.J. Epithelial-damaging virus infections affect vitamin A status in chickens. *J. Nutr.* 1992 :122 :333-339.
59. Wiertz, E.J.H.J et al. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC Class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell.* 1996 :84 :769-779.
60. Woods, K.V., Shillito, E.J., Splitz, M.R., Schantz, S.P. and Adler- Storthz, K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral. Pathol. Med.* 1993 :22 :101-108.
61. Yeudall, W.A. and Campo, M.S. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J. Gen. Virol.* 1991 :72 : 173-176.
62. York, I.A et al. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell.* 1994 :77 :525-535.

Instituto Nacional de Cancerología



INC002653