

Relación entre la expresión de la proteína p16 como biomarcador para Virus del Papiloma Humano y la clasificación TNM de carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello en centro de tercer nivel del nororiente colombiano

Andrés Camilo Macías Celis

Monografía de grado presentada para optar al título de Especialista en Patología

Director

Gabriel Eduardo Pérez García

Médico patólogo

Codirector

Tania Mendoza Herrera

Médica internista - Magíster en epidemiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Especialización en Patología

Bucaramanga

2025

Tabla de contenido

Introducción	11
1. Justificación	13
2. Pregunta de Investigación	14
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos:	15
4. Estado del arte	16
4.1 Definición	16
4.2 Epidemiología	17
4.3 Factores de riesgo	18
4.4 Mecanismos fisiopatológicos	20
4.4.1 <i>Origen</i>	20
4.4.2 <i>Cadena de eventos en carcinoma escamocelular VPH positivos.</i>	21
4.4.3 <i>Alteraciones genómicas y vías clave</i>	23
4.4.4 <i>Microambiente tumoral</i>	24
4.4.5 <i>Características clínicas</i>	24
4.5 Diagnóstico	25
4.6 Detección de la presencia de VPH	25
4.7 Subtipos histológicos del carcinoma escamocelular de cabeza y cuello asociado a VPH	26
4.8 Pronóstico	28
5. Propósito	29

6. Diseño metodológico	30
6.1 Diseño del estudio	30
6.2 Población	30
6.3 Tamaño de la muestra	30
6.4 Criterios de inclusión	31
6.5 Criterios de exclusión	32
7. Procedimientos para la recolección de la información	33
7.1 Fases del estudio	33
8. Materiales y métodos	34
8.1 Inmunohistoquímica	34
8.2 Preparación del tejido	34
8.2.1 <i>Fijación</i>	35
8.2.2 <i>Procesamiento</i>	35
8.2.3 <i>Inclusión del tejido</i>	36
8.2.4 <i>Microtomía</i>	36
8.2.5 <i>Tinción y montaje</i>	37
8.3 Interpretación de la inmunohistoquímica para P16	39
9. Evaluación crítica del protocolo	40
9.1 Ventajas del diseño	40
9.2 Desventajas del diseño	40
10. Variables	41
11. Instrumento del estudio	47
12. Plan del procesamiento de datos	48

12.1 Análisis univariado	48
12.2 Análisis bivariado	49
13. Consideraciones éticas	50
14. Tratamiento de los datos personales	53
15. Cronograma	54
16. Presupuesto	56
17. Resultados	57
18. Discusión y conclusiones	73
19. Compromisos por Parte del Equipo Investigador	76
20. Conformación y Trayectoria del Grupo de Investigación	77
Referencias bibliográficas	78
Anexos	83

Lista de figuras

Figura 1. <i>Localización anatómica de la neoplasia</i>	16
Figura 2. <i>Secuencia de eventos en carcinoma escamocelular</i>	20
Figura 3. <i>Cálculo del tamaño de muestra</i>	31
Figura 4. <i>Número de casos por sexo</i>	57
Figura 5. <i>Antecedente de consumo de alcohol</i>	58
Figura 6. <i>Antecedente de tabaquismo</i>	59
Figura 7. <i>Antecedente de exposición a otros tóxicos</i>	60
Figura 8. <i>Distribución anatómica de los casos</i>	61
Figura 9. <i>Grado de diferenciación de la neoplasia</i>	62
Figura 10. <i>Presencia de necrosis tumoral</i>	63
Figura 11. <i>Presencia de reacción desmoplásica</i>	64
Figura 12. <i>Presencia de invasión linfovascular</i>	65
Figura 13. <i>Presencia de invasión perineural</i>	66
Figura 14. <i>Expresión de p16</i>	67
Figura 15. <i>Severidad de la neoplasia por clasificación TNM</i>	68
Figura 16. <i>Expresión de p16 en relación con la edad</i>	69
Figura 17. <i>Severidad por TNM en relación a localización anatómica</i>	70

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Variables a estudiar y su operacionalización</i>	41
Tabla 2. <i>Análisis bivariado evaluando severidad</i>	71
Tabla 3. <i>Análisis bivariado con diferenciación por sexo</i>	71
Tabla 4. <i>Análisis bivariado evaluando la expresión de p16</i>	72

Lista de anexos

Anexo 1. Instrumentos Recolección de variables

83

Resumen

Título: Relación entre la expresión de la proteína p16 como biomarcador para Virus del Papiloma Humano y la clasificación TNM de carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello en centro de tercer nivel del nororiente colombiano.*

Autor: Andrés Camilo Macías Celis**

Palabras clave: VPH, p16, carcinoma escamocelular, cabeza y cuello.

Introducción. El VPH es un virus que pertenece a la familia de los *Papillomaviridae*, presenta una alta especificidad para infectar tanto los epitelios cutáneos como en mucosas, a través de viriones que no tienen cubierta y que contienen un genoma constituido por una doble cadena de ADN. A partir de la secuenciación genómica, se han logrado identificar 14 serotipos de VPH de alto riesgo que pueden ocasionar cáncer. Dentro de los principales factores asociados a carcinoma de cabeza y cuello están el alcohol y el tabaquismo. Sin embargo, en las últimas décadas se ha documentado un cambio en las características clínicas de los pacientes, presentándose a edades más tempranas y en asociación a infección por VPH. Actualmente, la detección de VPH se realiza mediante el uso de la inmunohistoquímica con el p16 por su relación costo-beneficio y fácil interpretación.

Objetivo. Determinar la asociación entre la expresión de la proteína p16 como biomarcador para VPH y calcular la severidad del TNM.

Metodología: Se realizó un estudio observacional analítico de tipo corte transversal retrospectivo con muestras anatomopatológicas de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cuyo estudio histopatológico se haya realizado en el Hospital Universitario de Santander en Bucaramanga dentro del periodo de 2017 a 2021. Teniendo en cuenta la disponibilidad de los bloques de parafina de la muestra y con cantidad suficiente de tejido para la elaboración de la tinción de inmunohistoquímica, excluyendo casos sin láminas de secciones histológicas o con diagnóstico de carcinoma escamocelular de origen cutáneo y del canal auditivo externo. Se verificaron los registros en la base de datos del Departamento de Patología correspondientes a especímenes quirúrgicos y biopsias de muestras de cabeza y cuello, y se escogieron los bloques con mayor representación de lesión tumoral para la posterior tinción de inmunohistoquímica de p16. Finalmente, se interpretó como positivo para VPH, la tinción nuclear y citoplasmática de la célula, en un valor mayor a 70% en las células tumorales.

*

**

Impacto. Este trabajo surgió debido a la necesidad de caracterizar la población con diagnóstico de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello relacionado con la expresión de p16 a través de técnicas inmunohistoquímica en una población representativa del nororiente colombiano, dado que según la evidencia está documentado que este tipo de neoplasias presentan un pronóstico favorable al detectar la presencia de VPH por medio de la expresión de la proteína p16. Permitió además sentar una línea de base para la utilización de la expresión por inmunohistoquímica de la proteína p16 como método de tamizaje para la detección de la infección por VPH en este tipo de carcinomas.

Abstract

Title: Relationship between p16 protein expression as a biomarker for HPV and TNM classification of head and neck squamous cell carcinomas in a tertiary level center in northeastern Colombia.**

Author: Andrés Camilo Macías Celis**

Key words. HPV, p16, squamous cell carcinoma, head and neck.

Introduction: HPV is a virus that belongs to the *Papillomaviridae* family, it presents a high specificity to infect both cutaneous epithelia and mucous membranes, through virions that have no cover and contain a genome consisting of a double stranded DNA. Based on genomic sequencing, 14 high-risk HPV serotypes that can cause cancer have been identified. One of the main factors associated with head and neck carcinoma is alcohol and smoking. However, in recent decades a change in the clinical characteristics of patients has been documented, presenting at younger ages and in association with HPV infection. Currently, HPV detection is performed using immunohistochemistry with p16 due to its cost-benefit ratio and easy interpretation.

Objective: To determine the association between p16 protein expression as a biomarker for HPV and to estimate the severity of TNM.

Methodology: A retrospective cross-sectional analytical observational study was performed with anatomopathological samples of patients older than 18 years with a diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck, whose histopathological study was performed at the Hospital Universitario de Santander in Bucaramanga within the period from 2017 to 2021. Taking into account the availability of the sample paraffine blocks and with sufficient amount of tissue for the elaboration of immunohistochemistry staining, excluding cases without histological section slides or with diagnosis of squamous cell carcinoma of cutaneous origin and external auditory canal. Records in the Pathology Department database corresponding to surgical specimens and biopsies of head and neck samples were checked, and the blocks with the highest representation of tumor lesion were chosen for subsequent p16 immunohistochemistry staining. Finally, nuclear and cytoplasmic staining of the cell was interpreted as positive for HPV, with a value greater than 70% in the tumor cells.

Impact: This work arose due to the need to characterize the population diagnosed with squamous cell carcinoma of the head and neck related to the expression of p16 through immunohistochemical techniques in a representative population of northeastern Colombia, since according to evidence it is documented that this type of neoplasms present a favorable prognosis when detecting the presence of HPV through the expression of p16 protein. It also allowed establishing a baseline for the use of immunohistochemical expression of p16 protein as a screening method for the detection of HPV infection in this type of carcinomas.

**

**

Introducción

El carcinoma escamocelular de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar dentro de todas las neoplasias malignas más comunes a nivel mundial, con alrededor de 89000 casos nuevos y 45000 muertes para el año 2018. En el sudeste asiático, Latinoamérica y la región de África subsahariana se encuentra dentro de las 10 primeras neoplasias malignas más comunes. En los últimos años se ha identificado un incremento en su incidencia, probablemente debido a cambios en las características sociodemográficas de la población. Clásicamente es una neoplasia que se ha asociado con el consumo de tabaco y alcohol, no obstante, se han descrito otros factores de riesgo como exposición a contaminantes ambientales, algunos factores que pueden ser más prevalentes en ciertas regiones dado las características culturales de una población, como es el caso de algunas comunidades de Asia y el pacífico, en donde existe una asociación del carcinoma de cavidad oral con el consumo de Betel masticable, y más recientemente se ha reconocido la asociación con infecciones por agentes virales de potencial oncogénico tales como el virus del papiloma humano y el virus del Epstein Barr. Existe un mayor riesgo de desarrollo de este tipo de neoplasia en el hombre, siendo el riesgo 2-4 veces mayor. La edad media de diagnóstico varía según el factor etiológico, dado que para aquellos procesos que se derivan del consumo de alcohol y tabaco, la edad media al momento del diagnóstico es de 66 años, mientras que, para las relacionadas con infección por el VPH, la edad media de diagnóstico es de 53 años, así mismo se ha determinado que los carcinomas asociados a VPH, presentan un pronóstico favorable, con incremento en la sobrevida en especial si no existen otros factores de riesgo asociados.

Actualmente para la detección del VPH en el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello existen varios métodos, que pueden ser realizados de manera aislada o en conjunto, siendo algunos

de ellos métodos directos y otros indirectos. Dentro de los más utilizados se encuentran: La inmunohistoquímica para p16, la hibridación in situ para ADN de VPH, hibridación in situ para detección de ARN de proteínas E6/E7, reacción en cadena de la polimerasa para ADN de VPH, como los test más importantes. Siendo la inmunohistoquímica para p16 uno de los test más ampliamente utilizados en laboratorios clínicos, dado su costo-efectividad y a que es un estudio que puede ser realizado en distintos tipos de muestra como los son tejidos fijados en formalina, bloques de parafina o en bloques celulares de citología, su interpretación es relativamente fácil, además tiene buena reproducibilidad interobservador.

Para entender la inmunohistoquímica para la proteína p16, es necesario conocer que la integración del ADN del VPH al genoma del huésped es un evento que ocurre tempranamente en la génesis del carcinoma, resultando en la producción de oncoproteínas virales E6/E7, que a su vez promueven el desarrollo de la neoplasia degradando el p53 y la proteína del retinoblastoma (Rb) que hacen parte de los genes supresores de tumores, resultando en una progresión incontrolada del ciclo celular. La p16 es una proteína supresora de tumores que es codificada por el gen CDKN2A (Inhibidor 2A de la ciclina dependiente de quinasa) que normalmente previene la proliferación de células lesionadas inhibiendo la activación de la proteína Rb. Por consiguiente, la degradación de Rb mediada por la oncoproteína E7 resulta en la sobreexpresión de p16.

Actualmente el número de series de casos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello en nuestra población, es limitado. Teniendo en cuenta que el Hospital Universitario de Santander es un centro de referencia del nororiente colombiano, se presenta este estudio observacional analítico de tipo corte transversal, en el que se realizó tinción de inmunohistoquímica para p16 con el objetivo de determinar la asociación de su expresión en los carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello, con la severidad medida mediante la clasificación TNM.

1. Justificación

Las neoplasias malignas de cabeza y cuello constituyen el sexto cáncer más prevalente, presentando en Estados Unidos y Europa datos del 3 a 4%, con una incidencia global aproximada de 500000 casos cada año y una mortalidad aproximada del 50%. El panorama epidemiológico en Colombia para el periodo comprendido entre 2007 a 2011, fue de 62818 cánceres de los cuales 1494 corresponden a neoplasias a nivel de labio, cavidad oral y faringe. (1)

Los principales factores de riesgo descritos para este tipo de neoplasias son el consumo de tabaco y alcohol, pero en los últimos años, se han incrementado las tasas de esta neoplasia relacionada con infección por cepas de alto riesgo de VPH, lo que conlleva a establecer estrategias para caracterizar estos pacientes clínicamente diferentes a los que se originan por factores como el alcohol y tabaco. Para ello se pretende utilizar la tinción de inmunohistoquímica para expresión de la proteína p16, un método que posee buena sensibilidad, buena reproducibilidad y bajo costo. Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo establecer una línea de base para el municipio de Bucaramanga que permita fortalecer programas de promoción y prevención de esta entidad.

2. Pregunta de Investigación

¿Cuál es la relación de la expresión de la proteína p16 y la clasificación de severidad de TNM en carcinoma escamocelular de cabeza y cuello en un centro de tercer nivel del nororiente colombiano?

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la asociación entre la expresión de la p16 como biomarcador para VPH y la clasificación de severidad de TNM de carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello en la población mayor de 18 años en el municipio de Bucaramanga.

3.2 Objetivos específicos:

1. Caracterización de la población
2. Establecer la prevalencia de región anatómica comprometida.
3. Estratificar la severidad por estadiaje TNM de los casos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello según localización anatómica.
4. Estratificar la severidad por estadiaje TNM de los casos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello según género del paciente.
5. Estratificar la severidad por estadiaje TNM de los casos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello según grupo etario.
6. Estratificar la severidad por estadiaje TNM en los casos de carcinoma escamocelular con expresión de proteína p16.
7. Indicar la variante histopatológica de carcinoma escamocelular más prevalente.
8. Establecer el grado de diferenciación de la neoplasia estratificando por expresión de proteína p16.

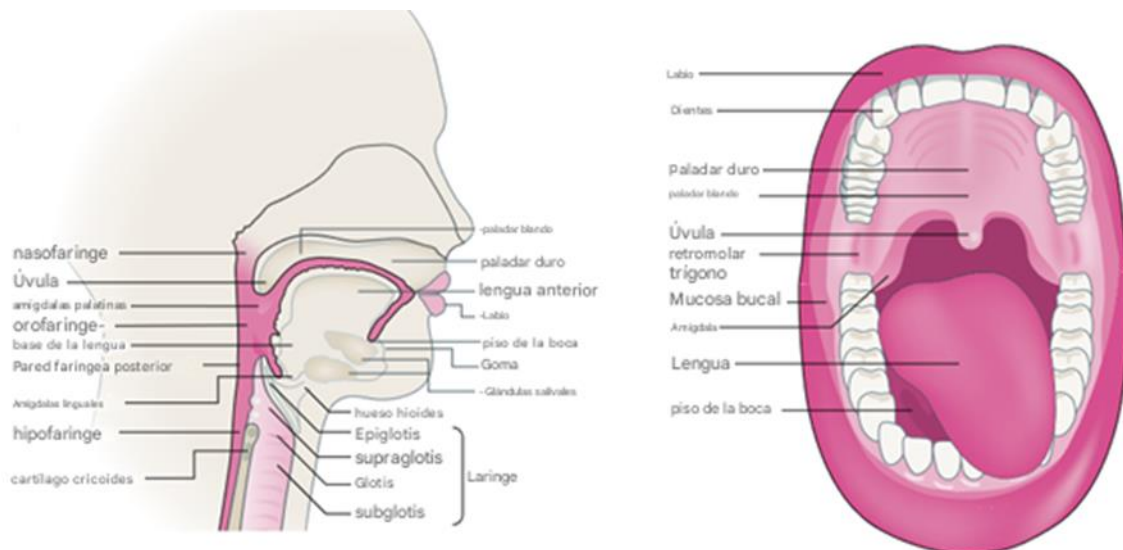
4. Estado del arte

4.1 Definición

El carcinoma escamocelular de cabeza y cuello es una entidad que se desarrolla a partir del epitelio de la mucosa de regiones anatómicas que incluyen estructuras como la nasofaringe, cavidad oral (labios, mucosa bucal, paladar duro, lengua anterior, piso de la boca y triángulo retromolar), orofaringe (tonsilas palatinas, tonsilas linguales, base de la lengua, paladar blando, úvula y pared posterior de la faringe), hipofaringe (parte inferior de la garganta que se extiende del hioides al cartílago cricoides) y la laringe.

Figura 1.

Localización anatómica de la neoplasia



Cabe destacar que es la lesión maligna que con mayor frecuencia se deriva de esta región. Esta neoplasia se desarrolla con mayor frecuencia en las tonsilas palatinas y está asociada a genotipos de alto riesgo del VPH. (2).

4.2 Epidemiología

En cuanto a la epidemiología de esta neoplasia datos del estudio de carga mundial de la enfermedad, los cánceres derivados del labio y la cavidad oral, se encuentran en el lugar 15 de todos los cánceres más comunes a nivel mundial y en el sudeste asiático, Latinoamérica y África subsahariana ocupan un lugar dentro de las 10 neoplasias malignas más comunes. Por otra parte, el cáncer derivado de laringe y faringe ocupan el lugar 20 y 24 respectivamente. Durante la última década se ha documentado un incremento en su incidencia cerca del 36.5%. Para tener una perspectiva los datos en Estados Unidos arrojan que este tipo de neoplasias constituyen el 3%, con aproximadamente 63000 casos al año y 13000 muertes relacionadas. Así mismo se ha reconocido que existe una mayor predilección por el sexo masculino con una proporción variable de 2:1 a 4:1, sin embargo, en algunas áreas como Europa central, Brasil, Hong Kong, India la incidencia de este tipo de tumores en hombres puede ser de 20 por 100000 personas, sumado a esto la evidencia ha documentado que existe una presentación más frecuente en personas Afroamericanas. (3) En Colombia los datos existentes sobre este tipo de neoplasias son escasos, debido a que ha permanecido sin grandes cambios en los últimos 10 años, sin embargo, para el periodo comprendido entre 2007 a 2011, se estimó que para los carcinomas de labio, cavidad oral y faringe la tasa de incidencia en hombres fue de 4, mientras que para mujeres fue 3.1 con tasas de mortalidad de 1.5 y 0.9 respectivamente. (4). En el caso de los carcinomas orofaríngeos asociados

a VPH la incidencia ha crecido en las últimas cuatro décadas; particularmente en las regiones de Norteamérica y el norte de Europa, estos pacientes típicamente son masculinos, de raza blanca y con un nivel socioeconómico alto, no obstante, a través del paso del tiempo la prevalencia de este tipo de neoplasias ha ido elevándose en adultos de más edad, incrementando la edad media de presentación de 55-58 años. (5)

4.3 Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo más ampliamente reconocidos, están el consumo de tabaco y alcohol, exposición a contaminantes ambientales e infecciones con agentes virales de potencial oncogénico como lo son el VPH y el virus del Epstein Barr. Es conocido que muchos de estos factores tienden a ser más prevalentes de acuerdo a las características geográficas y culturales de las poblaciones, en el caso del tabaco y alcohol estos tienen una distribución homogénea a nivel global. No obstante, en poblaciones de Asia y el pacífico, el carcinoma de cavidad oral está asociado a masticar productos de nuez de areca, así como otros tipos de especias de consumo local. (6) Otros factores de riesgo reconocibles incluyen la edad, pobre higiene oral y dietas bajas en vegetales.

Al consumo de tabaco y alcohol se le atribuye un efecto del 75% de los casos y cuando se combinan obtienen un efecto sinérgico. El tabaco se encuentra más relacionado con el carcinoma de laringe, mientras que el consumo de alcohol con carcinoma de cavidad oral y faringe. Aquellos pacientes con historia de tabaquismo pesado tienen entre 5-25 veces más riesgo de desarrollar carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. El consumo de alcohol puede incrementar este riesgo, con estimaciones que indican que una persona que tiene historia de consumo de 40 paquetes/año

o más y que consume 5 bebidas alcohólicas por día, tiene 40 veces más riesgo de contraer carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. (7)

Continuando con los agentes virales, la infección persistente con VPH y virus de Epstein Barr se conocen como agentes etiológicos sobre todo de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello en la región de orofaringe y nasofaringe, estas poblaciones muestran unas características especiales y es que hay una mayor prevalencia en el género masculino, a pesar de que las tasas de infección anogenital por VPH se mantienen similares en ambos sexos. La transmisión del VPH se da principalmente por la práctica de sexo oral y su incidencia sigue en aumento, especialmente en aquellas poblaciones que no están vacunadas contra el virus, previa a la exposición con este. (8)

Se han expuesto alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo de este tipo de tumor, por ejemplo, los pacientes con anemia de Fanconi (una enfermedad genética caracterizada por un daño en la reparación del ADN), tienen 500 a 700 veces más riesgo de desarrollar carcinoma escamocelular primario de la cavidad oral, a pesar de ello, no se ha logrado dilucidar cuál es el mecanismo que lo origina. Algunos metaanálisis han mostrado que ciertos polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de carcinógenos y de inmunidad están asociados con un riesgo elevado, dentro de estas alteraciones se incluyen polimorfismos en CTLA4, IL10 y citocromo p450 1A1. (6)

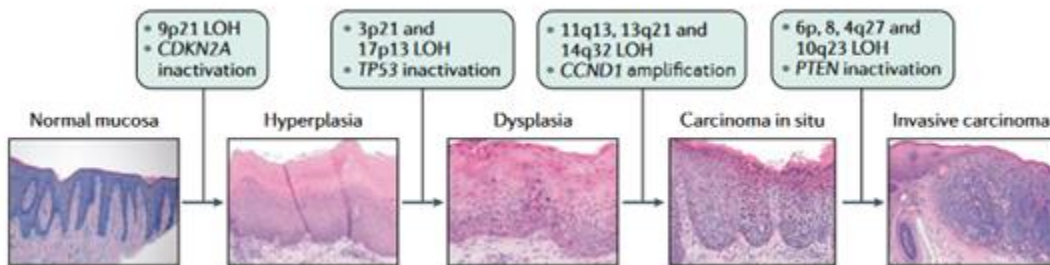
4.4 Mecanismos fisiopatológicos

4.4.1 Origen

El carcinoma escamocelular tiene su origen en el epitelio que recubre la mucosa de la cavidad oral, faringe, laringe y tracto sinonasal. Histológicamente, la progresión a carcinoma invasivo sigue una serie de pasos, que comienza con hiperplasia de células epiteliales, seguido por displasia (leve, moderada y severa), posteriormente carcinoma in situ y últimamente carcinoma invasivo. (Figura 2). (6)

Figura 2.

Secuencia de eventos en carcinoma escamocelular



La mayoría de los pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular no tienen historia de lesión premaligna. Dado esto, el origen del carcinoma depende de la localización anatómica y el agente etiológico, a partir de lo cual, tanto las células madre adultas o progenitoras tienen potencial de transformación oncogénica a células madre cancerígenas, con capacidad de autorenovación y pluripotencialidad. Igualmente existe un número importante de marcadores biomoleculares que se han propuesto, dentro de los cuales el CD44, CD133 y ALDH1, son los que

mayor significancia pronóstica poseen. El CD44 es un receptor de ácido hialurónico y de matriz de metaloproteinasas y se encuentra involucrado en interacciones intercelulares y migración celular, aquellas células que expresan altos niveles de CD44 poseen la capacidad de autorenovación, además estos se asocian a metástasis y un peor pronóstico. De igual modo el CD133 se encuentra relacionado con carcinoma escamocelular invasivo y metastásico. La ALDH1 es una enzima intracelular que transforma el retinol en ácido retinoico, la cual cumple un papel importante en la detoxificación y es un marcador de células madre normales y células tumorales. Niveles elevados de expresión de ALDH1, se han asociado a una mayor actividad de autorenovación, invasión y tasas elevadas de metástasis, también teniendo un rol destacado en el pronóstico. De otra forma, las células tumorales, expresan marcadores de células madre como OCT3, OCT4, SOX2 y NANOG, que cuando se encuentran en valores elevados, existe correlación con el grado tumoral en cánceres de cavidad oral. (6)

4.4.2 Cadena de eventos en carcinoma escamocelular VPH positivos.

La infección por VPH es un evento que ha tomado mayor fuerza en los últimos años y se ha asociado con gran relevancia en una cantidad importante de los cánceres orofaríngeos (>70%) y en menor medida con cánceres de otras localizaciones a nivel de cabeza y cuello. La infección es un evento que ocurre de manera precoz en este tipo neoplasias, el principal serotipo etiológicamente relacionado con el desarrollo de lesión tumoral maligna es el VPH-16, no obstante, en una pequeña proporción de pacientes se ha documentado también la presencia de otros serotipos de alto riesgo (VPH-18, VPH-31, VPH-33 y VPH-52). El VPH hace parte de la familia de los *Papillomavirus*; el virión, se encuentra constituido por una doble cadena de ADN circular,

rodeado por una cápsula de pequeño tamaño, conformada por 2 proteínas estructurales y que mide 55 nm de diámetro. El genoma del VPH integra tanto genes tempranos (E) como tardíos (L) que terminaran codificando para proteínas tempranas (E1-E7) y tardías (L1-L2). Los genes tardíos (L1-L2) están relacionados con proteínas de la cápside viral, mientras que los genes tempranos (E1-E5) codifican proteínas que se encuentran encargados de la replicación y transcripción del genoma viral. Los genes E6 y E7 juegan un rol fundamental para la transformación oncogénica de la célula hospedadora. Entendiendo esto, los mecanismos oncogénicos que produce la infección por VPH comienzan cuando en lesiones mucocutáneas (tipo heridas o abrasiones), el VPH infecta las células basales del epitelio, estas son las únicas con capacidad replicativa dentro del epitelio, en relación a esto se ha documentado que la maduración viral tiene una estrecha asociación con el grado de diferenciación epitelial, por lo que la expresión de antígenos virales tempranos se localiza con mayor predominancia en las células del estrato basal y por otro lado los tardíos se hallan en los estratos más superficiales. Existe una pérdida de regulación de la apoptosis y el ciclo celular, esto ocurre de manera temprana en aquellos tumores que tienen como etiología el VPH. Inicialmente se consideraba que la integración del VPH en el genoma de la célula huésped era el punto clave, pero ahora diversos estudios han encontrado que la transcripción del ARN mensajero de E6 y E7 del VPH-16, en casos como el carcinoma de amígdala no es dependiente de la integración del ADN viral de la célula infectada. Otro de los mecanismos oncogénicos es la capacidad de la proteína E6 para provocar la degradación del gen supresor tumoral p53, sumado a que se encarga de inhibir la telomerasa, enzima encargada de preservar la estabilidad del ADN, lo que finalmente se traduce en disfunción apoptótica e inestabilidad celular. En cuanto a la proteína E7, esta se encarga de inactivar la proteína retinoblástica, que promueve la liberación de factores de

transcripción, que activan genes encargados de regular el ciclo celular, lo que favorece una mayor proliferación celular. Finalmente, esto conlleva a un exceso de p16. (6)

Los carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello con positividad para VPH, presentan diversas expresiones moleculares que no se encuentran en los negativos para VPH, entonces los carcinomas VPH + muestran inhibición del p53, proteína retinoblástica y ciclina D1. Al mismo tiempo se ha registrado que las proteínas E6-E7 tienen capacidad de inhibir los genes supresores de tumores p53 y la proteína del retinoblastoma, cuando esto ocurre, los genes supresores de tumores reanudan su función normal y comienzan la apoptosis de las células lesionadas. Con el dato anterior se presupone que se requiere un mínimo de 2 años de infección por VPH para iniciar el proceso oncogénico. (9)

4.4.3 Alteraciones genómicas y vías clave

Este tipo de carcinomas se caracterizan por inestabilidad genética, con alteraciones de regiones cromosómicas; por ejemplo, la pérdida de 9p21 ocurre durante la progresión del epitelio normal de la mucosa a hiperplasia, esta región cromosómica incluye genes de supresión tumoral como CDKN2A (que codifica para CDK4 y el inhibidor CDK6 de p16) y ARF (codifica para p14, un estabilizador de p53). Luego la progresión de hiperplasia a displasia está dada por pérdida de 3p21 y 17p13, el sitio donde está ubicado el TP53. La transición de displasia a carcinoma in situ involucra la pérdida de 11q13, 13q21 y 14q32 y la pérdida de 6p, 8, 4q27 y 10q23 es observada en la progresión a carcinoma invasivo. (6)

4.4.4 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral hace referencia a un complejo de mezcla entre células tumorales y estromales, que incluyen células endoteliales, fibroblastos asociados a cáncer y células inmunes. Las células tumorales y los fibroblastos asociados a cáncer producen factores de crecimiento como el VEGF, que se encarga de incorporar células endoteliales, provocando neovascularización, suplencia de oxígeno y nutrientes al tumor. Por otro lado, las células endoteliales se encargan de emitir factores que contribuyen a soportar la supervivencia y renovación de las células tumorales. Los fibroblastos asociados a cáncer tienen una característica especial y es que poseen expresión para la actina de músculo liso alfa, adicionalmente secretan un espectro amplio de factores de crecimiento como (EGF, VEGF y HGF), citoquinas (IL-6) y quemoquinas que promueven el crecimiento tumoral, la angiogénesis y el enrolamiento de células inmunes. (6)

4.4.5 Características clínicas

La presentación clínica para los carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello, varía dependiendo de la localización anatómica de la lesión, por ejemplo para aquellos procesos ubicados en la cavidad oral, pueden ser asintomáticos en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que para etapas avanzadas usualmente los pacientes pueden presentarse con sensación de masa, ulceración, disfagia, alteración en la sensibilidad y restricción para los movimientos de la lengua (10,11).

4.5 Diagnóstico

En el momento del diagnóstico, cada paciente presenta manifestaciones clínicas diversas dependiendo de la localización y extensión tumoral. Es recomendable que en estos pacientes se efectúe una anamnesis y exploración física minuciosa mediante inspección y palpación. A partir de esto todas las sospechas diagnósticas deberán ser confirmadas mediante estudio anatomopatológico para tipificar la neoplasia mediante biopsia, así mismo debe acompañarse de técnicas de imagen para determinar el estadiaje de la enfermedad. (12) El carcinoma escamocelular de cabeza y cuello asociado a VPH presenta unas características sociodemográficas especiales, se suele diagnosticar más en población joven, con un estatus socioeconómico más alto (nivel educacional alto, posición profesional alta y unos ingresos más altos). Los primeros síntomas que pueden presentarse son odinofagia, sensación de masa, disfagia o edema cervical, a veces este último puede ser el primer síntoma por el que los pacientes consultan. (13)

4.6 Detección de la presencia de VPH

En cuanto a la detección de VPH en el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, se han desarrollado varios métodos, los cuales pueden ser realizados de manera conjunta o en solitario, los más ampliamente reconocidos son: la inmunohistoquímica p16, la hibridación in situ para ADN de VPH, hibridación in situ para detección de ARN de proteínas E6/E7, reacción en cadena de la polimerasa para ADN de VPH. De los anteriormente nombrados, uno de los más utilizados por su relación costo-efectiva es la inmunohistoquímica para p16. Para entender la inmunohistoquímica para la proteína p16, es necesario conocer que la integración del ADN del VPH al genoma del

huésped es un evento que ocurre tempranamente en los carcinomas orofaríngeos que se derivan de la infección, resultando en la producción de oncoproteínas virales VPH E6/E7, a su vez estas oncoproteínas promueven la carcinogénesis degradando el p53 y la proteína Rb, que hacen parte los genes supresores de tumores, resultando en una progresión incontrolada del ciclo celular. La p16 es una proteína supresora de tumores que es codificada por el gen CDKN2A (Inhibidor 2A de la ciclina dependiente de quinasa) que normalmente previene la proliferación de células lesionadas inhibiendo la activación de la proteína Rb. Por consiguiente, la degradación de Rb mediada por la oncoproteína E7 resulta en la sobreexpresión de p16. Como resultado de esto, la expresión de p16 usando inmunohistoquímica es un marcador altamente sensitivo para detectar la infección por VPH con cepas de alto riesgo. La inmunohistoquímica para p16 es uno de los test más ampliamente utilizados en los laboratorios clínicos, dado su costo-efectividad y a que puede ser realizado en tejidos fijados en formalina, bloques de parafina y en bloques celulares de citología. Su interpretación es relativamente fácil y tiene buena reproducibilidad interobservador. Además, uno de sus mayores beneficios es que su regulación es independiente del subtipo de VPH, lo que le confiere una excelente sensibilidad. (14)

4.7 Subtipos histológicos del carcinoma escamocelular de cabeza y cuello asociado a VPH

La mayoría de carcinomas en esta localización anatómica corresponden a carcinomas escamocelulares no queratinizantes, caracterizados por estar constituidos por células tumorales con bordes celulares indistinguibles, citoplasma eosinofílico moderado y núcleos ovals a fusiformes con hiper cromasia, que pueden tener nucleolos conspicuos y una relación núcleo:citoplasma elevada. Estas células se disponen infiltrando el estroma a manera de nidos y

lóbulos, pueden asociarse a necrosis central, presentando también características que indican falta de buena diferenciación del carcinoma como lo son la ausencia de puentes intercelulares y de queratinización citoplasmática (formación de perlas córneas). Los subtipos morfológicos de carcinomas escamocelulares que pueden presentarse en la región de cabeza y cuello son amplios, dentro de los más reconocidos se encuentran el acantolítico, que se caracteriza por una interrupción de las conexiones intercelulares de los queratinocitos de la epidermis creando una apariencia que asemeja glándulas; el carcinoma adenoescamoso, constituido por componentes de adenocarcinoma y carcinoma escamocelular; carcinoma escamocelular basaloide conformado por islas de células de apariencia basaloide que suelen tener comedonecrosis y una elevada tasa mitótica; carcinoma linfoepitelial, es un carcinoma con mínima diferenciación escamosa y un número importante de linfocitos acompañantes dispersos, no neoplásicos; carcinoma papilar, constituido por múltiples proyecciones papilares delgadas y filiformes que pueden tener o no queratinización; carcinoma escamocelular fusiforme (sarcomatoide), ausencia de arquitectura epitelial, conformado por células fusiformes a ahusadas, se puede desarrollar por transformación de un carcinoma escamocelular convencional; carcinoma verrucoso, este subtipo localizado frecuentemente en cavidad oral, presenta arquitectura verrucosa con ausencia de atipia citológica considerable y que muestra un patrón de infiltración expansivo y por último el carcinoma cuniculado, se caracteriza por ser bien diferenciado, con criptas que contienen queratina y abundantes neutrófilos intraepiteliales y estromales (15).

Por otra parte, los carcinomas escamocelulares tienen un perfil de expresión de inmunohistoquímica con positividad para los marcadores de diferenciación epitelial como citoqueratina AE1/AE3 o de diferenciación propiamente escamosa como CK5/6, p63 y p40 (15).

4.8 Pronóstico

Los factores pronóstico más significativos son el tamaño tumoral, profundidad de la invasión, estado nodal y presencia de metástasis a distancia. Los factores histopatológicos asociados con un peor pronóstico incluyen un patrón de invasión no cohesivo, la gemación tumoral, invasión perineural y linfovascular, así como infiltración ósea. No obstante, los pacientes con carcinomas asociados a VPH tienen mejores desenlaces en cuanto a supervivencia, sin embargo, esto puede ser atenuado por los efectos adversos del cigarrillo (15).

5. Propósito

Con el presente estudio se buscó mejorar la utilidad de la expresión de p16 en el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, realizados en un centro de tercer nivel del nororiente colombiano, para establecer una adecuada clasificación de este tipo de neoplasias asociadas a la infección por VPH e impacto en el pronóstico.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño del estudio

Este estudio es observacional analítico de tipo corte transversal con muestreo no probabilístico concurrente del cual se tomaron variables clínicas y sociodemográficas descritas en el formato de orden de solicitud de estudio histopatológico, de las biopsias de pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello procesadas en el Hospital Universitario de Santander en el periodo comprendido entre enero de 2017 y diciembre de 2021.

6.2 Población

Muestras anatomopatológicas (especímenes quirúrgicos y biopsias) de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cuyo estudio histopatológico se haya realizado en el Hospital Universitario de Santander.

6.3 Tamaño de la muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra en este estudio de corte transversal, se utilizó un software de código abierto para salud pública, OPENEPI65 y se tomaron los resultados expuestos en la revisión sistemática de artículos que miden la probabilidad diagnóstica de expresión de proteína p16 presente en el estudio de Sichero y colaboradores (16).

Figura 3.*Cálculo del tamaño de muestra*

Tamaño muestral: transversal, de cohorte, y ensayo clínico			
Nivel de significación de dos lados(1-alpha)			95
Potencia (1-beta,% probabilidad de detección)			80
Razón de tamaño de la muestra, Expuesto/No Expuesto			1
Porcentaje de No Expuestos positivos			22
Porcentaje de Expuestos positivos			36
Odds Ratio:			2
Razón de riesgo/prevalencia			1.6
Diferencia riesgo/prevalencia			14
	Kelsey	Fleiss	Fleiss con CC
Tamaño de la muestra - Expuestos	163	162	176
Tamaño de la muestra- No expuestos	163	162	176
Tamaño total de la muestra	326	324	352
Referencias			
Kelsey y otros, Métodos en Epidemiología Observacional 2da Edición, Tabla 12-15			
Fleiss, Métodos Estadísticos para Relaciones y Proporciones, fórmulas 3.18&, 3.19			
CC= corrección de continuidad			
Los resultados se redondean por el entero más cercano			
Imprima desde el menú del navegador o seleccione copiar y pegar a otros programas.			
Resultados de OpenEpi, versión 3, la calculadora de código abiertoSSCohort			
Imprimir desde el navegador con ctrl-P			

6.4 Criterios de inclusión

- Pacientes admitidos en el Hospital Universitario de Santander con diagnóstico de Carcinoma escamocelular de cabeza y cuello.
- Disponibilidad de los bloques de parafina de la muestra anatomopatológica (Especimen quirúrgico y biopsias) y con cantidad suficiente de tejido para realización de la tinción de inmunohistoquímica.

6.5 Criterios de exclusión

- Casos sin láminas de secciones histológicas.
- Muestras anatomopatológicas de pacientes que no hayan sido procesadas en el Hospital Universitario de Santander.
- Pacientes con diagnóstico de Carcinoma escamocelular de cabeza y cuello de origen cutáneo, del canal auditivo externo.
- Pacientes con diagnóstico de otros tipos de neoplasia en cabeza y cuello

7. Procedimientos para la recolección de la información

7.1 Fases del estudio

Fase 1: En la primera etapa se revisaron los registros de especímenes quirúrgicos y biopsias de muestras de cabeza y cuello realizados dentro del periodo de 2017 a 2021 ingresados en la base de datos del departamento de patología de la E.S.E Hospital Universitario de Santander, para obtener los casos que cumplen con los criterios de inclusión que fueron parte del estudio. Esta fase tuvo una duración de 4 meses.

Fase 2: En la segunda etapa se diligenció el instrumento (Anexo 1) con las variables establecidas y se alimentó la base de datos en hojas de Excel. Esta fase tuvo una duración de tres meses.

8. Materiales y métodos

8.1 Inmunohistoquímica

Constituye a día de hoy una herramienta que hace parte del diagnóstico en patología, se trata de un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una gran diversidad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Lo anterior basado en la capacidad de los anticuerpos para unirse de forma específica a los antígenos correspondientes; la reacción se hace visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz produciendo una coloración. Esta técnica tiene diversas aplicaciones dentro del campo de la histopatología del diagnóstico y sus principales áreas de aplicación son: definir los diferentes tipos celulares en patología tumoral e inflamatoria, evaluar la presencia de indicadores pronóstico, identificación de agentes infecciosos, determinar el depósito de inmunocomplejos en enfermedades autoinmunes, proveer indicadores para posibles terapias y evaluar la activación celular y vías apoptóticas. (17)

8.2 Preparación del tejido

El manejo del tejido, desde su muestreo hasta la fijación y procesamiento, presenta un rango amplio de variables, cada una de las cuales puede tener un efecto determinante en el resultado final de la inmunohistoquímica. Un resultado óptimo está determinado por una estandarización de todas estas variables, para finalmente dar consistencia y reproducibilidad del producto final. (17)

8.2.1 Fijación

Los tejidos donde se va realizar la inmunohistoquímica se encuentran fijados, no obstante, existe la posibilidad de que la técnica sea realizada sobre tejidos de biopsias por congelación, usualmente para dar un diagnóstico ágil en la evaluación de márgenes de sección en ciertos especímenes. Consecuencias de una pobre fijación, pueden ser la demostración de antígenos que normalmente se localizan en el núcleo, citoplasma o membrana celular en compartimentos celulares inapropiados. (17)

El elemento fijador más ampliamente utilizado en histopatología es el formaldehído, en su forma de formalina bufferada al 10%, dado que provee estándares aceptables de fijación y al mismo tiempo permite el alcance completo de todas las investigaciones histopatológicas que requieran ser tomadas, incluyendo análisis molecular retrospectivo. (18)

8.2.2 Procesamiento

Para examinar una muestra al microscopio de luz el tejido debe estar adelgazado lo suficiente para permitir el paso de la luz (Aproximadamente 5 micras). Esto se consigue incluyendo el tejido en un medio sólido lo suficientemente firme para proveer soporte y permitir el paso de un cuchillo a través de él sin dañar el borde de corte. El medio de inclusión más comúnmente implementado en histopatología es la parafina. Esta se encuentra en forma líquida a temperaturas de 58°C, por lo que permite permear el tejido. Cuando se enfría a temperatura ambiente, la parafina se solidifica con casi ningún daño sobre el tejido. De esta forma sostiene el

tejido y puede ser cortada fácilmente. El tejido fijado debe ser sometido a una serie de pasos para permitir su impregnación con la parafina, estos son:

Deshidratación: Se utiliza alcohol para deshidratar el espécimen, usualmente alcohol metílico industrial. El proceso comienza con una solución de alcohol metílico al 70%, incrementándose a 100% para remover todos los restos de agua.

Limpieza: El alcohol y la parafina son inmiscibles, por lo que se utiliza un agente limpiador, que se mezcla con ambos agentes, con frecuencia se utiliza el xileno.

Impregnación: Finalmente el tejido es impregnado en cera de parafina fundida. Usualmente se requieren dos o tres cambios de cera. (17)

8.2.3 Inclusión del tejido

El propósito de la inclusión del tejido es crear un bloque de parafina que contenga dentro de él el tejido correctamente orientado para la microtomía. El primer paso es recuperar el cassette que contiene el tejido y abrirlo, una vez abierto el operador, selecciona un molde de tamaño adecuado y distribuye parafina fundida dentro del molde. Luego el tejido es ubicado en el molde y orientado correctamente, posteriormente se transfiere al punto frío donde la parafina se solidifica. (17)

8.2.4 Microtomía

Para ver el tejido bajo el microscopio debe ser adelgazado lo suficiente para permitir el paso de la luz y ser montado en una lámina de microscopio. Se realizan cortes de 3-5 micras de

espesor, para lo cual se requiere de un micrótopo y cuchillas desechables especializadas. El micrótopo es un dispositivo mecánico que utiliza un sistema rotatorio que permite el avance del bloque de tejido a la cuchilla con un número regulado de micrómetros. El grosor del corte resultante está determinado por la distancia del tejido que avanza en cada carrera de corte. (17)

8.2.5 Tinción y montaje

La mayoría de tintes utilizados son a base de agua y el tejido en este punto se encuentra incluido en parafina, por lo que esta debe ser removida para permitir la tinción del tejido y se consigue utilizando xileno, usualmente tres cambios de 30-40 segundos de duración cada uno. Esta etapa se suele denominar como limpieza, ya que el tejido se vuelve transparente cuando la parafina es removida. Sin embargo, el xileno es inmisible en agua, entonces se utiliza alcohol metílico para su remoción. Cierta grado de agitación se recomienda durante las etapas para agilizar el proceso. En este punto varias tinciones se pueden emplear, usualmente la tinción de hematoxilina y eosina es la que se emplea en todos los tejidos. (17)

La secuencia de pasos en la inmunohistoquímica son los siguientes: Recuperación del antígeno, reparación del anticuerpo primario, aplicación del anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario y adición de un agente de detección para localizar el anticuerpo primario. La recuperación del antígeno incluye el pretratamiento del tejido para recuperar antígenos que están enmascarados por la fijación y los hace más accesibles para la unión a los anticuerpos. Existen varios métodos de recuperación del antígeno dependiendo del antígeno objetivo y el anticuerpo, pero generalmente consisten en romper enlaces cruzados de proteínas causados por fijación, a partir de bases químicas o físicas. Las medidas físicas incluyen calor y ultrasonido, mientras que

las químicas incluyen la digestión enzimática y tratamiento desnaturalizante, no obstante, muchas veces se realiza una combinación de las dos, por ejemplo, tratamiento químico con calor. Actualmente el método más usado es la recuperación del antígeno por inducción de calor, usando hornos microondas. El anticuerpo primario, que puede ser monoclonal o policlonal, es titulado para optimizar el contraste entre una tinción tisular positiva y una tinción del fondo no específica. En general, los anticuerpos monoclonales, que tienen como objetivo un solo epítipo, tienden a ser más específicos, mientras que los anticuerpos policlonales que se unen a varios epítipos, tienden a ser más sensibles. (18)

Para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo bajo microscopía de luz, ya sea el anticuerpo primario o secundario, que se dirige contra la inmunoglobulina de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, debe ser etiquetado. En el método directo el anticuerpo primario es etiquetado y aplicado en el tejido en un proceso rápido; sin embargo, este método no es comúnmente usado dado la falta de amplificación de la señal y el requerimiento de una alta concentración de anticuerpo, así como la necesidad de marcar cada anticuerpo primario. En el método indirecto, el anticuerpo secundario es marcado, permitiendo la amplificación de la señal y el uso de diferentes anticuerpos primarios. Existen varios marcadores que se pueden usar, tales como moléculas fluorescentes y enzimas (fosfatasa alcalina o peroxidasa) que producen una coloración característica después de su incubación con un sustrato cromogénico, como lo es la diaminobenzidina. (18)

8.3 Interpretación de la inmunohistoquímica para P16

Se interpretó un resultado como positivo para VPH, la tinción nuclear con tinción citoplasmática de la célula, en un valor mayor a 70% de células positivas para p16. El resultado se interpretó como negativo cuando la tinción no alcance los valores anteriormente nombrados. (19) (20) (21)

Luego de haber realizado la tinción de inmunohistoquímica para p16 en cada caso seleccionado según criterios de inclusión, se realizó el diligenciamiento del instrumento de recolección de los datos.

9. Evaluación crítica del protocolo

El diseño del estudio como corte transversal retrospectivo permitió determinar si existe o no relación entre la expresión de la proteína p16 (por inmunohistoquímica) y la severidad de la neoplasia medida por la clasificación TNM.

9.1 Ventajas del diseño

El diseño propuesto presenta diversas ventajas, en primer lugar, se destaca su costo efectividad, debido a que se fundamenta en datos ya recopilados en registros histopatológicos. Además, el tiempo de realización es relativamente rápido y permite el análisis de diversas variables (sociodemográficas, características histopatológicas de la neoplasia y estadiaje de la enfermedad). Por otra parte, existe poca interferencia por parte del investigador al no requerir intervención o manipulación de las variables.

9.2 Desventajas del diseño

La principal desventaja es el tamaño de la muestra, ya que podría ocasionar un sesgo de selección al no estar representada adecuadamente la población general, por lo que los resultados podrían no ser extrapolables. Además, no se pueden determinar relaciones de causa y efecto.

10. Variables

Las variables estudiadas y su operacionalización se describen en la tabla 1.

Tabla 1.

Variables a estudiar y su operacionalización

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
EDAD	Edad confirmada según orden de solicitud de biopsia y base de datos del servicio de patología.	Número entero en años.	Cuantitativo discreto.
GÉNERO	Género confirmado según orden de solicitud de biopsia y base de datos del servicio de patología.	Femenino o masculino	Cualitativa, nominal dicotómica
TABAQUISMO	Consumo de cigarrillo/tabaco en la actualidad	Antecedente de consumo de cigarrillo/tabaco según registro de antecedentes en orden de solicitud de biopsia y base de datos del servicio de patología.	Cualitativa nominal dicotómica.

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
CONSUMO DE ALCOHOL	Consumo de alcohol en la actualidad	Antecedente de consumo de alcohol según registro de antecedentes en orden de solicitud de biopsia y base de datos del servicio de patología.	Cualitativa nominal dicotómica
EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A TÓXICOS	Exposición durante un periodo de tiempo prolongado, en su vida laboral a agentes tóxicos como percloretileno, asbesto, pesticidas	Antecedentes de exposición a agentes tóxicos según registro de antecedentes en orden de solicitud de biopsia y base de datos del servicio de patología.	Cualitativa nominal, politómica
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA NEOPLASIA	Región anatómica en donde se localizó la neoplasia.	Localización anatómica donde se reportó la neoplasia en la biopsia, obtenida durante el procedimiento quirúrgico.	Cualitativa nominal politómica
CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE CABEZA Y CUELLO	Carcinoma escamocelular en mucosa de localización anatómica comprendida entre	Información disponible en reporte de biopsia institucional realizada en el departamento de patología de la universidad industrial de Santander.	Cuantitativa nominal dicotómica

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
	cavidad nasal y laringe		
SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR	Clasificación de la variante de carcinoma escamocelular según las características morfológicas histológicas.	Descripción microscópica y diagnóstico en reporte de biopsia institucional realizada en el departamento de patología de la universidad industrial de Santander.	Cualitativa nominal, politómica
CARACTERÍSTICAS DE BUENA DIFERENCIACIÓN DE LA LESIÓN NEOPLÁSICA	1. Presencia de cordones o islas de células grandes con citoplasma eosinófilo. 2. Presencia de puentes intercelulares prominentes 3. Formación de perlas córneas.	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
CARACTERÍSTICAS DE POBRE DIFERENCIACIÓN DE LA LESIÓN NEOPLÁSICA	1. Presencia de pleomorfismo nuclear 2. Presencia de hiperchromasia nuclear 3. Aumento del número de mitosis.	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica.
INMUNOHISTOQUÍMICA PARA P16	Se interpretará un resultado como positivo para VPH, la tinción nuclear con o sin tinción citoplasmática de la célula, en un valor mayor a 70% de células positivas para p16	Resultado de inmunohistoquímica que será realizado.	Cualitativa nominal dicotómica.
NECROSIS TUMORAL	Presencia de células tumorales necróticas.	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
REACCIÓN DESMOPLÁSICA	Presencia de tejido fibroso en medio de células tumorales	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica
INVASIÓN VASCULAR	Presencia de células tumorales dentro del espacio linfovascular.	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica
INVASIÓN PERINEURAL	Células tumorales que rodean o invaden los nervios.	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa nominal dicotómica
TAMAÑO DE LA NEOPLASIA	Presencia o no de tumor primario y las dimensiones del mismo.	Descripción macroscópica del Reporte de biopsia institucional, pruebas de imagen reportadas en orden de solicitud de biopsia.	Cuantitativa continua
EXTENSIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	Compromiso metastásico de ganglios linfáticos regionales por carcinoma	Descripción microscópica del reporte de biopsia institucional/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cuantitativa discreta

NOMBRE DE LA	DEFINICIÓN	DEFINICIÓN	ESCALA DE
VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL	MEDICIÓN
METÁSTASIS A	escamocelular de cabeza y cuello. Compromiso de otros órganos o tejidos distantes a la lesión primaria.	Pruebas de imagen reportadas en formato de solicitud de biopsia y en la base de datos del servicio de patología.	Cualitativa nominal dicotómica.
DISTANCIA			

11. Instrumento del estudio

Ver anexo 1.

12. Plan del procesamiento de datos

Las muestras del estudio provienen de bloques de parafina que contienen la biopsias y especímenes quirúrgicos realizados en el Hospital Universitario de Santander; estas muestras se encuentran en custodia en el Laboratorio de Patología del Hospital Universitario de Santander ubicado en la ciudad de Bucaramanga. A los bloques de los casos, que cumplieron con los criterios de inclusión del proyecto, se les asignó un código de identificación aleatorio, para su posterior corte con el fin de hacer la lámina que pasó a tinción de inmunohistoquímica para p16 y su respectivo proceso descrito anteriormente en el numeral 10 (Materiales y métodos). Este paso se realizó en el laboratorio que custodia las muestras. La información obtenida se consignó en la base de datos de Excel construida para tal fin, la cual se exportó y analizó con STATA 12.0 donde se ejecutó el análisis descriptivo, bivariado.

12.1 Análisis univariado

Las variables recolectadas fueron evaluadas según su nivel de medición (medias o medianas para las variables continuas con medidas de dispersión como la desviación estándar para variables de distribución normal y mediana, recorrido para las de distribución no normal, y las categóricas se analizaron mediante proporciones). Se reportaron los respectivos intervalos de confianza del 95%.

12.2 Análisis bivariado

Para determinar la relación entre cada una de las variables independientes con la severidad por estadiaje TNM se realizó un análisis bivariado, utilizando la regresión logística, que precisó el cálculo de medidas de efecto como el ODDS RATIO (OR).

13. Consideraciones éticas

El presente trabajo está clasificado como una “investigación sin riesgo”, de acuerdo al literal “A” del artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia: “Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos, y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios, y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta” que en nuestro caso implica la revisión del resumen de historia clínica anotado en la orden de solicitud de la biopsia.

"Dando cumplimiento a lo dispuesto en la Ley Estatutaria 1581 de 2012, a su Decreto Reglamentario 1377 de 2013 y a la Resolución de Rectoría 1227 de 2013, la Universidad Industrial de Santander adopta la política nacional para el tratamiento de datos personales, la cual será informada a todos los titulares de los datos recolectados o que en el futuro se obtengan en el ejercicio de las actividades académicas, culturales, comerciales o laborales derivadas de este proyecto de investigación. En tal sentido, el investigador principal de este proyecto manifiesta que garantiza los derechos de la privacidad, la intimidad y el buen nombre de los sujetos de investigación, en el tratamiento de los datos personales, y en consecuencia todas sus actuaciones se regirán por los principios de legalidad, finalidad, libertad, veracidad o calidad, transparencia, acceso y circulación restringida, seguridad y confidencialidad. Lo anterior implica que todas las personas que en desarrollo de las diferentes actividades del proyecto llegarán a suministrar cualquier tipo de información o dato personal podrán conocerla, actualizarla, rectificarla o suprimirla."

Los datos socio-demográficos, clínicos y hallazgos microscópicos obtenidos en el análisis de los casos fueron de carácter confidencial, con finalidad académica y científica. La identidad de los pacientes y sus datos personales, no son del interés del grupo de investigación y no se incluyeron dentro de las bases de datos que se utilizaron en el presente estudio. Para efectos de análisis se utilizó el número del consecutivo de la muestra anatomopatológica y el año en que se realizó la toma de la misma, correspondiente a la nomenclatura asignada por protocolo institucional por el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander, permitiendo el acceso a la base de datos para consignar las variables que fueron estudiadas, solo a los investigadores principales del proyecto.

En ningún momento de la investigación fue necesario contactar a los pacientes, lo que garantizó la protección de los datos personales.

Se declara que no se contó con la financiación de laboratorios farmacéuticos, ni proveedores de insumos o equipos biomédicos. De igual modo tampoco se ofreció estímulo económico de ninguna índole cumpliendo con los siguientes principios:

Principio de respeto: Se cumplió este principio a través de una codificación especial de la muestra de tejido para emplearla de manera anónima, con esto se respetará la identidad de los pacientes.

Principio de beneficencia: Se cumplió este principio al prevenir la identificación del paciente y se realizó omisión de procedimientos que no tengan adecuada validación que puedan llevar a dar conclusiones incorrectas que generen daño sobre los pacientes.

Principio de no maleficencia: Se cumplió este principio al garantizar la realización de procesamiento de tejidos, tinción de inmunohistoquímica, lectura e interpretación de resultados, a partir de una formación teórica adecuada y practicas estandarizadas.

Principio de Justicia: Se garantizó cumplimiento a este principio, por medio del desarrollo de métodos que permitan garantizar un adecuado procesamiento y técnicas de inmunohistoquímica, así como la lectura e interpretación de los hallazgos histopatológicos de las muestras susceptibles de estudio. Se mantuvo la codificación especial para garantizar anonimidad de los pacientes.

14. Tratamiento de los datos personales

Para la realización del presente estudio se ejecutaron los siguientes pasos:

1. Revisión de los casos del sistema de archivo del Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander, que cumplieron con los criterios de selección para ingreso: Correspondieron a muestras de cabeza y cuello y que dentro de la solicitud del estudio histopatológico tuvieran los datos clínicos requeridos, todo esto utilizando el consecutivo de la solicitud del estudio histopatológico (para mantener la anonimidad de los pacientes), posteriormente se verificó en las bases de datos del departamento que el diagnóstico de las muestras sea el de carcinoma escamocelular y se encuentre dentro de la localización anatómica de la cabeza y el cuello.

2. Posteriormente se realizó consignación de los datos según el instrumento de recolección de las variables (anexo 1).

3. Diligenciamiento de la base de datos en un archivo en formato Excel, para posterior análisis e interpretación estadística (el acceso a la base de datos realizada solo fue permitido a los investigadores principales de este proyecto).

4. Revisión del archivo de láminas con tinción de hematoxilina y eosina de los casos seleccionados, y se identificó el bloque de tejido con mejor representación de lesión en el que se realizó la inmunohistoquímica para p16.

15. Cronograma

Actividad	Julio – octubre 2022	Noviembre-diciembre 2022	Enero-Abril 2023	Mayo 2023	Junio-julio 2023	Agosto-noviembre 2023	Diciembre 2023- febrero 2024	Marzo – julio	Julio-Agosto 2024	Septiembre 2024 – enero 2025
Elaboración protocolo	X									
Sustentación y presentación al CEINCI		X								
Sustentación y presentación al comité de ética del HUS			X							
Presentación de modificación es realizadas al CEINCI				X						

16. Presupuesto

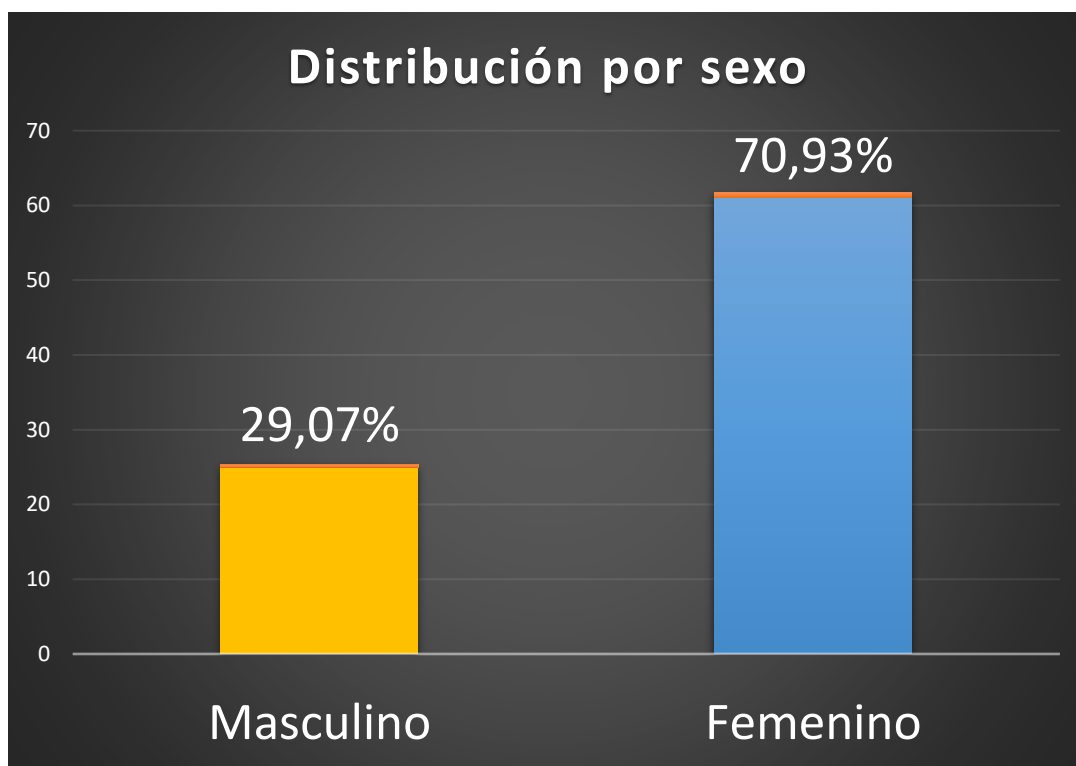
Ítem	RUBRO	FINANCIACIÓN UIS 2022		FINANCIACIÓN UIS 2023		FINANCIACIÓN OTRA(S) INSTITUCIÓN(ES) 2022		FINANCIACIÓN OTRA(S) INSTITUCIÓN(ES) 2023		TOTAL
		Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	
1	Honorarios	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 89.439.936	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 89.439.936
2	Auxiliares estudiantiles	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
3	Riesgos laborales estudiantiles	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
4	Servicios Técnicos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
5	Pasajes	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
6	Viáticos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
7	Gastos de viaje	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
8	Equipos de laboratorio	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
9	Maquinaria	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
10	Prácticas docentes y salidas de campo	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
11	Reparación y mantenimiento	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
12	Reactivos y materiales de laboratorio	\$ -	\$ -	\$ 1.276.061	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 1.276.061
13	Licencias de software	\$ -	\$ -	\$ 4.469.581	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 4.469.581
14	Papelera y útiles de escritorio	\$ -	\$ -	\$ 800.000	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 800.000
15	Libros y material bibliográfico	\$ -	\$ -	\$ 3.000.000	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 3.000.000
16	Equipo audiovisual	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
17	Equipo de oficina	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
18	Equipo de cómputo	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
19	Muebles y enseres	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
20	Elementos de laboratorio	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
21	Herramientas	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
22	Montaje e instalaciones	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
23	Adecuaciones	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
24	Arrendamientos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
25	Seguros	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
26	Capacitación de personal	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
27	Portes y fletes	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
28	Acarreos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
29	Avisos e impresos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
30	Semovientes	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
31	Gastos de importación	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
TOTAL		\$ -	\$ -	\$ 9.545.642	\$ 89.439.936	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 98.985.578

17. Resultados

Se analizaron 86 especímenes y biopsias con diagnóstico de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello de pacientes entre 32 y 102 años, de los cuales 61 eran mujeres (70.9%). La edad media fue de 70.36 años (+/- 14.07). Además, la mayor parte de los casos severos correspondieron al sexo masculino (66.6%). (Figura 4)

Figura 4.

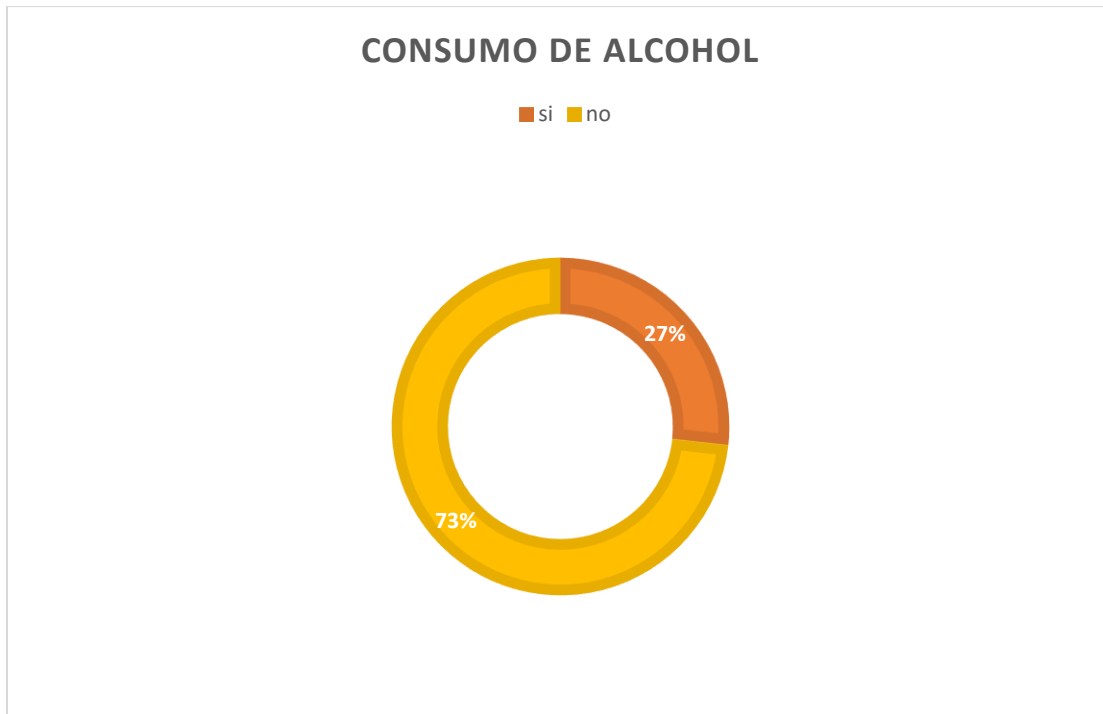
Número de casos por sexo



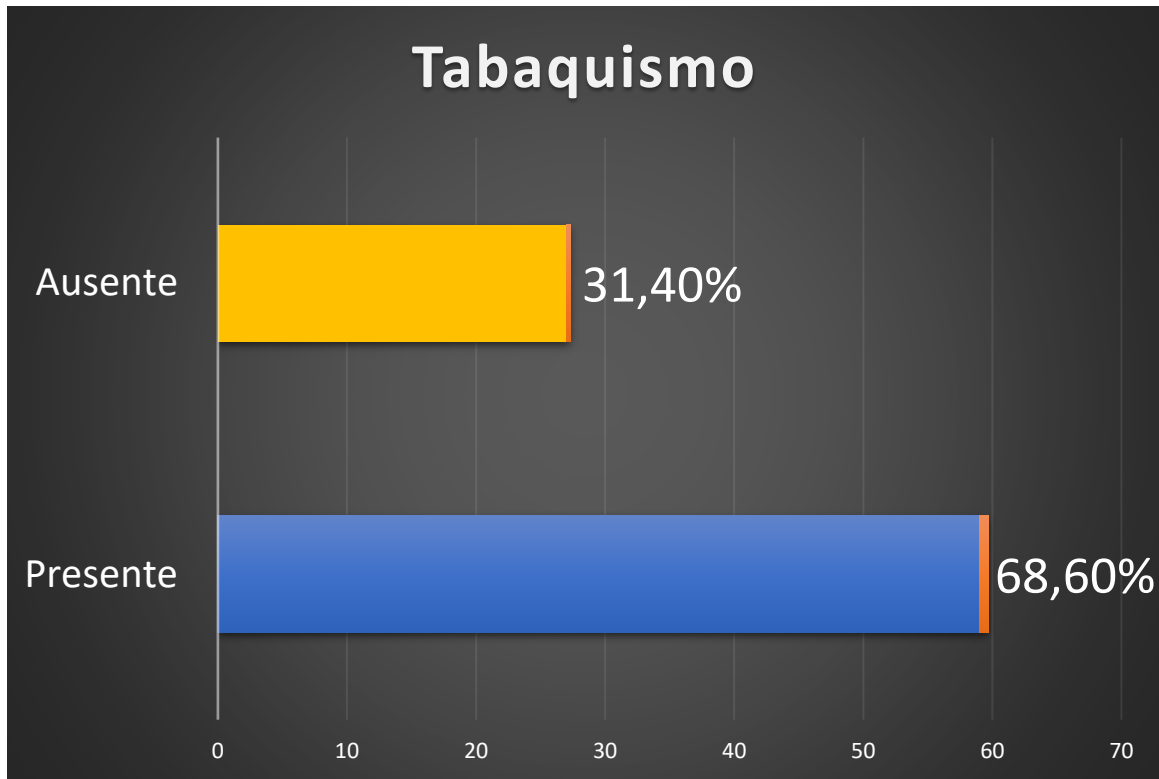
Con respecto a los antecedentes, el consumo de alcohol estuvo presente en el 26.7% (23 personas), siendo más frecuente el consumo en la población masculina (91.3%) en comparación con la población femenina. (Figura 5)

Figura 5.

Antecedente de consumo de alcohol



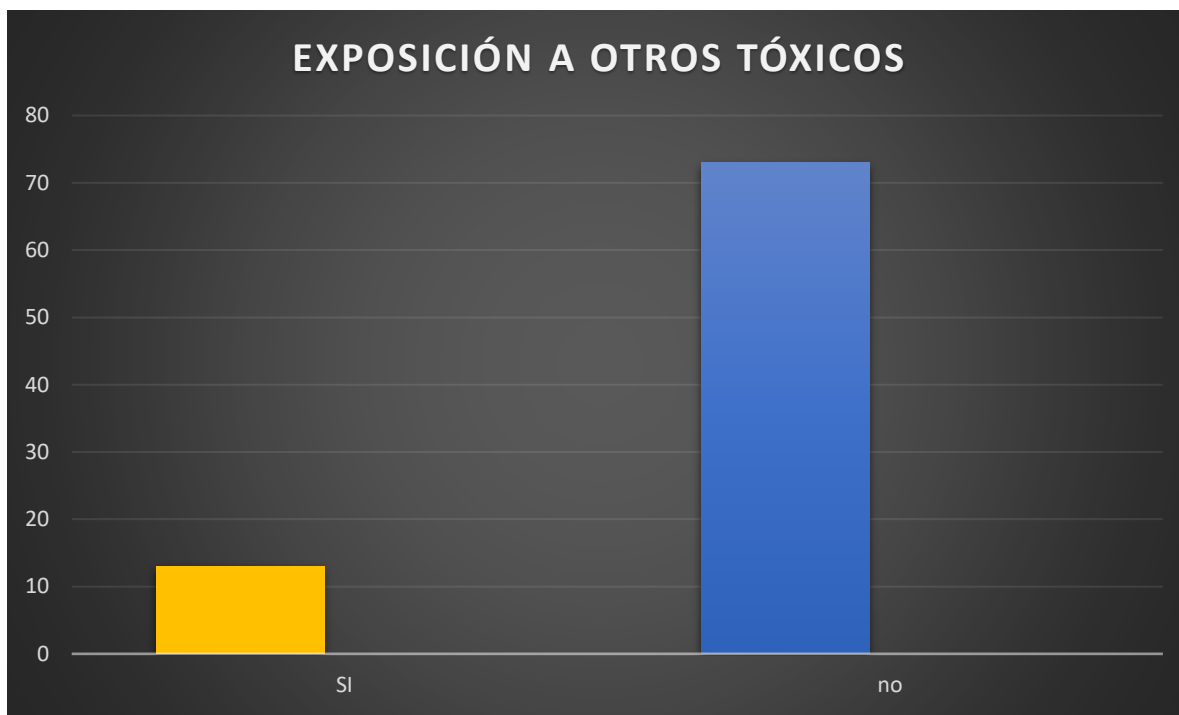
Por otro lado, el consumo de tabaco se documentó en un 68.6% (59 personas) siendo más frecuente el consumo en la población masculina (77.96%) en comparación con la población femenina (Figura 6)

Figura 6.*Antecedente de tabaquismo*

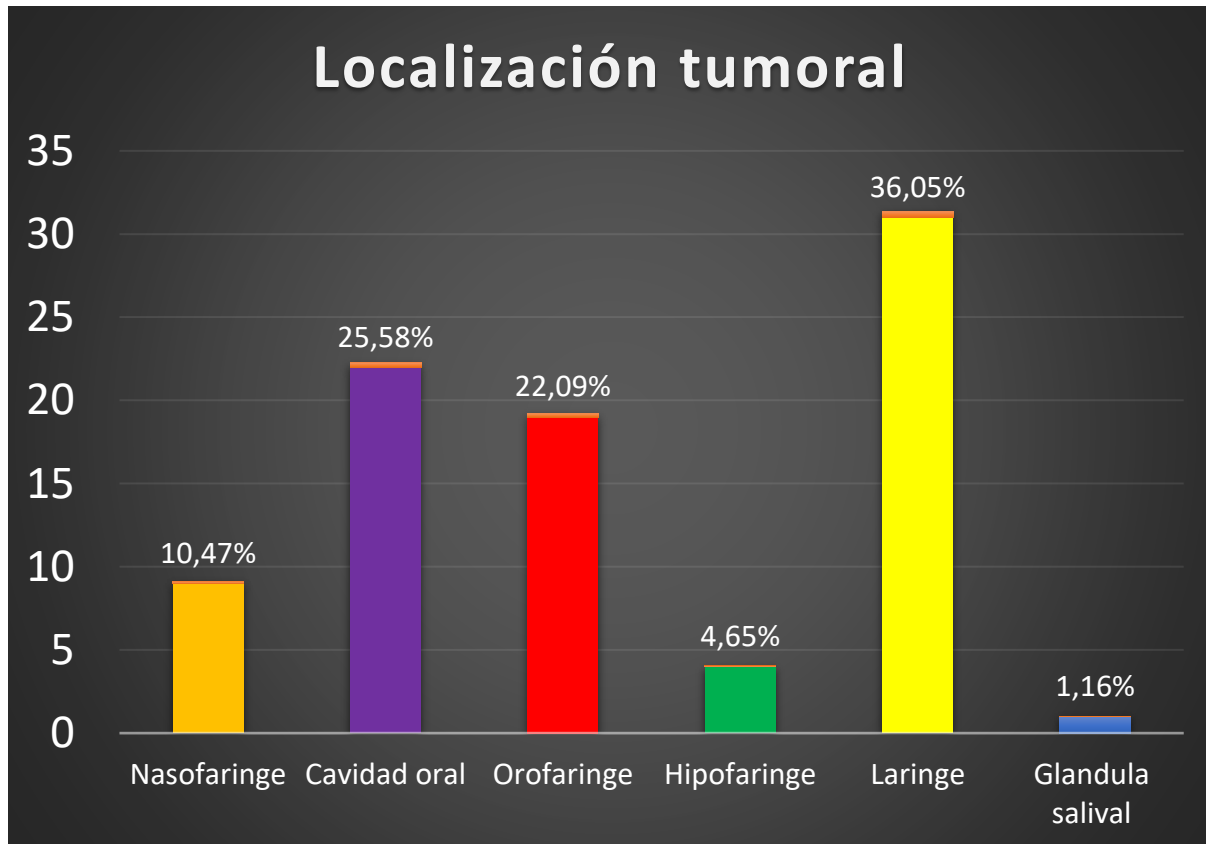
Además, la exposición a otros tóxicos estuvo presente en un 15.12% (13 personas) de la población evaluada. (Figura 7)

Figura 7.

Antecedente de exposición a otros tóxicos



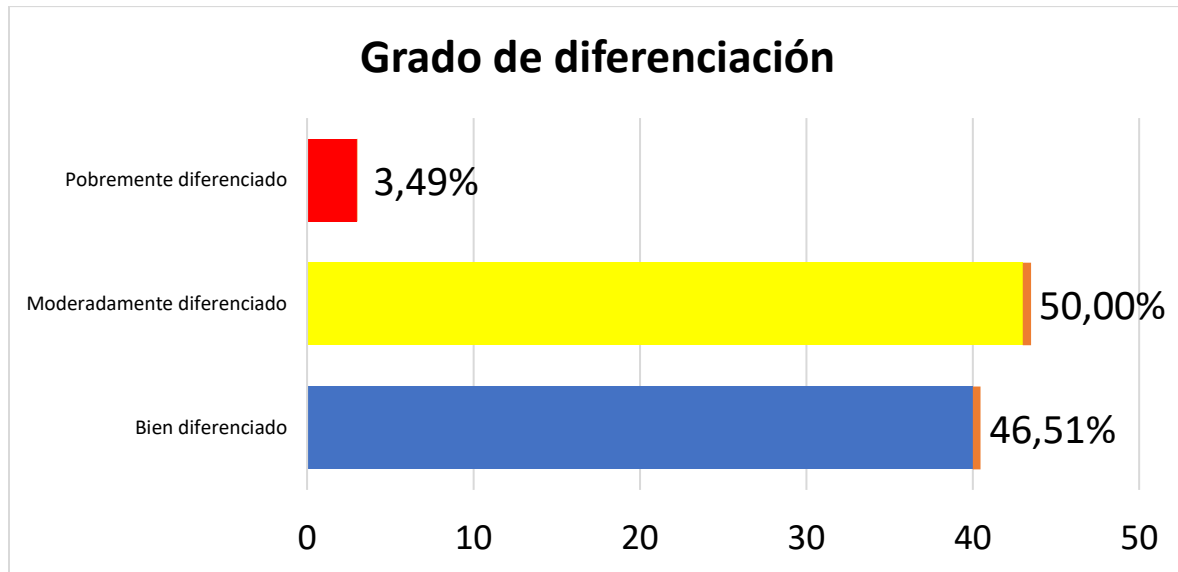
En cuanto a la localización anatómica del carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, el sitio más frecuentemente comprometido es la laringe correspondiendo a un 36.05%. El resto de sitios por orden descendente es cavidad oral (25.4%), orofaringe (22.09%), nasofaringe (10.4%), hipofaringe (4.65%) y por último la ubicación menos frecuente es la glándula salival (1.16%). Por otra parte, teniendo en cuenta la expresión de p16 la localización más frecuentemente comprometida es la orofaringe, correspondiendo a un 38.46% de los casos. (Figura 8)

Figura 8.*Distribución anatómica de los casos*

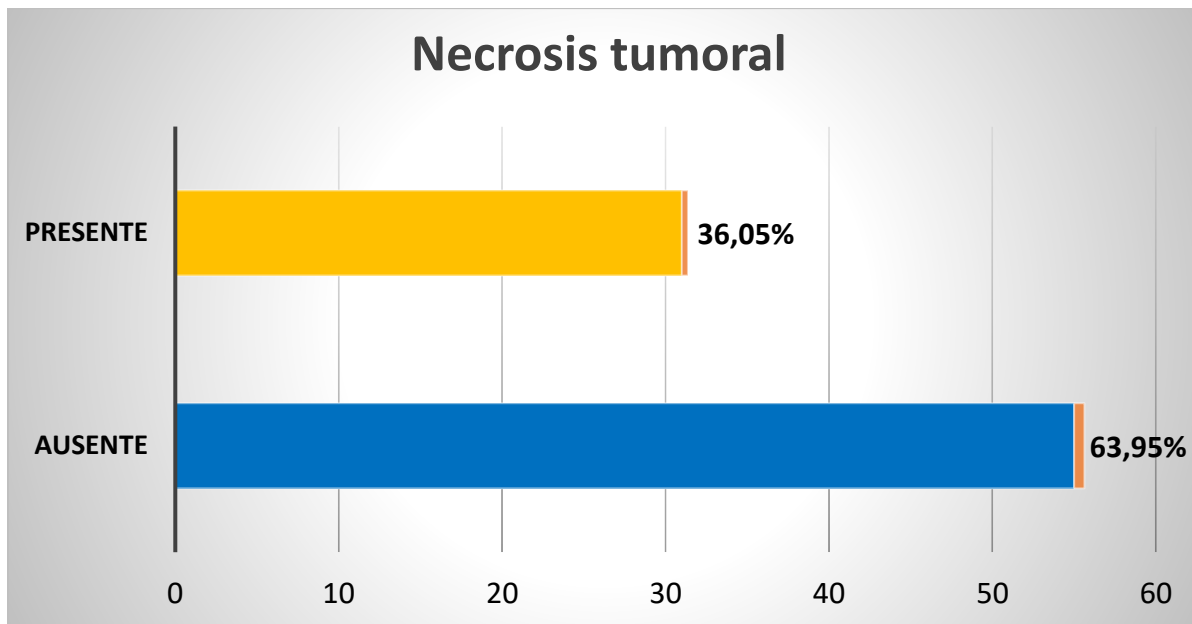
El grado de diferenciación de la neoplasia, con mayor frecuencia de presentación es moderadamente diferenciado (50%) y es el que más se encontró en los especímenes con expresión de p16 (69.2%), seguido de bien diferenciado (46.5%) y pobremente diferenciado (3.49%). (Figura 9).

Figura 9.

Grado de diferenciación de la neoplasia



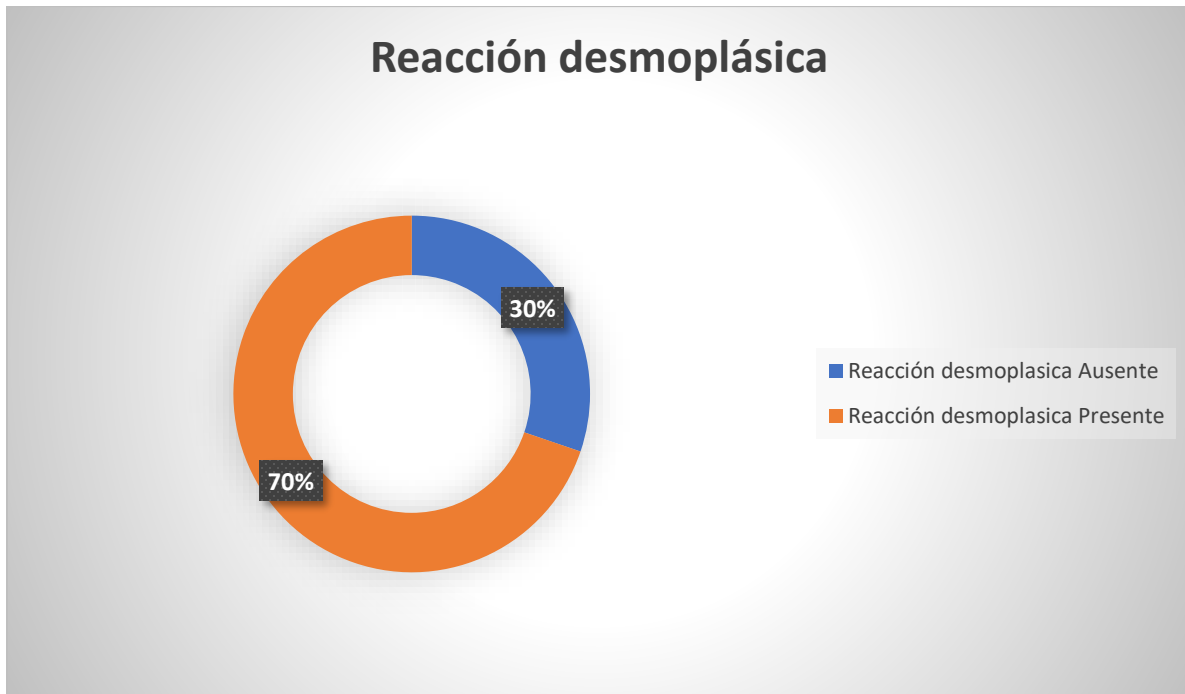
En las muestras evaluadas, la asociación con necrosis tumoral se observó sólo en 31 biopsias y especímenes (36.05%). (Figura 10)

Figura 10.*Presencia de necrosis tumoral*

La presencia de reacción desmoplásica, es una característica que se identificó con mayor frecuencia en el 69.76% de las muestras evaluadas (Figura 11).

Figura 11.

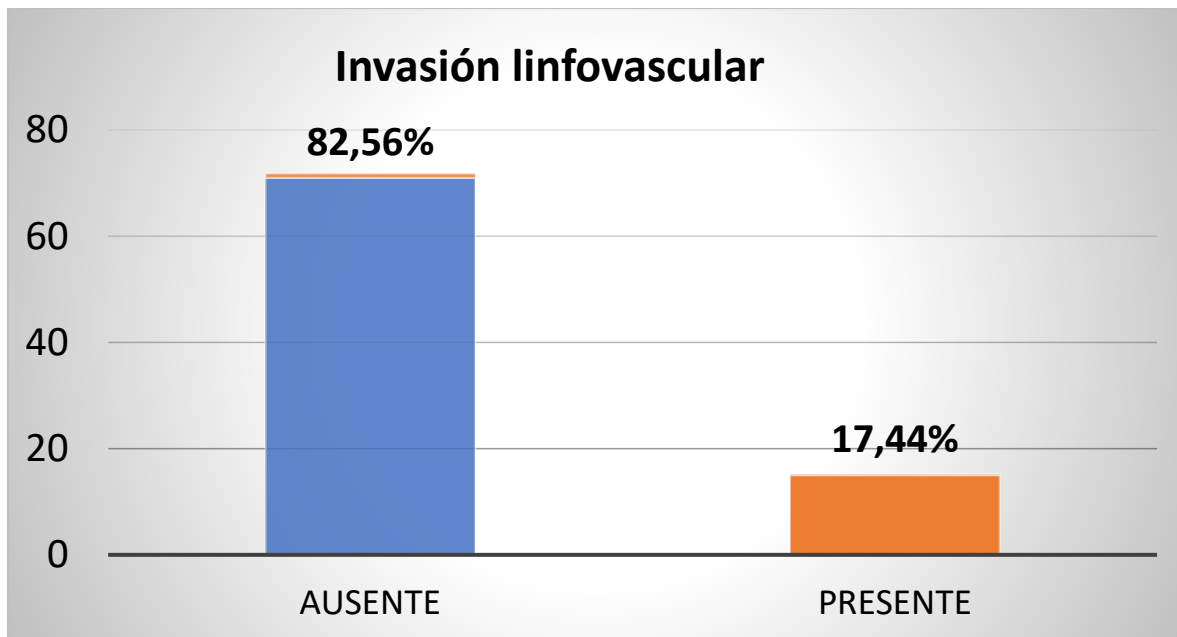
Presencia de reacción desmoplásica



Respecto a la invasión linfovascular en las muestras evaluadas solo estuvo presente en el 17.44% de las biopsias y especímenes (n:16), (Figura 12).

Figura 12.

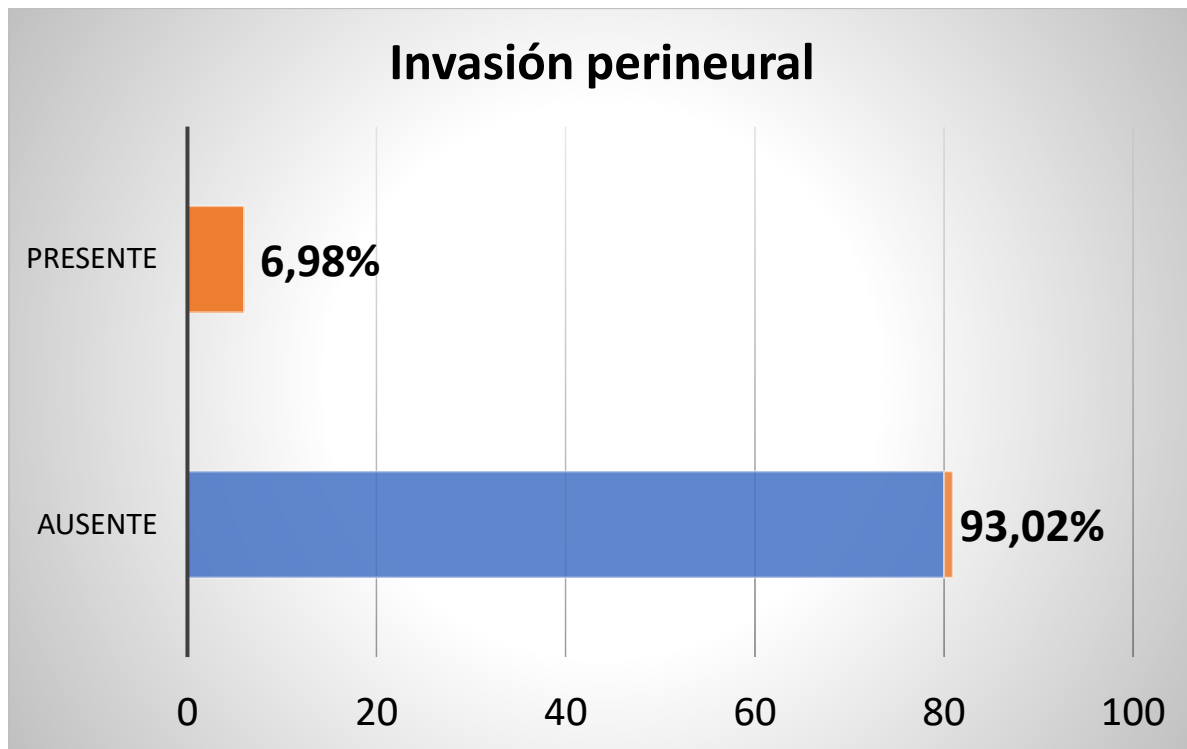
Presencia de invasión linfovascular



La invasión perineural fue una característica que solo se observó en el 6.98% de los casos. (Figura 13)

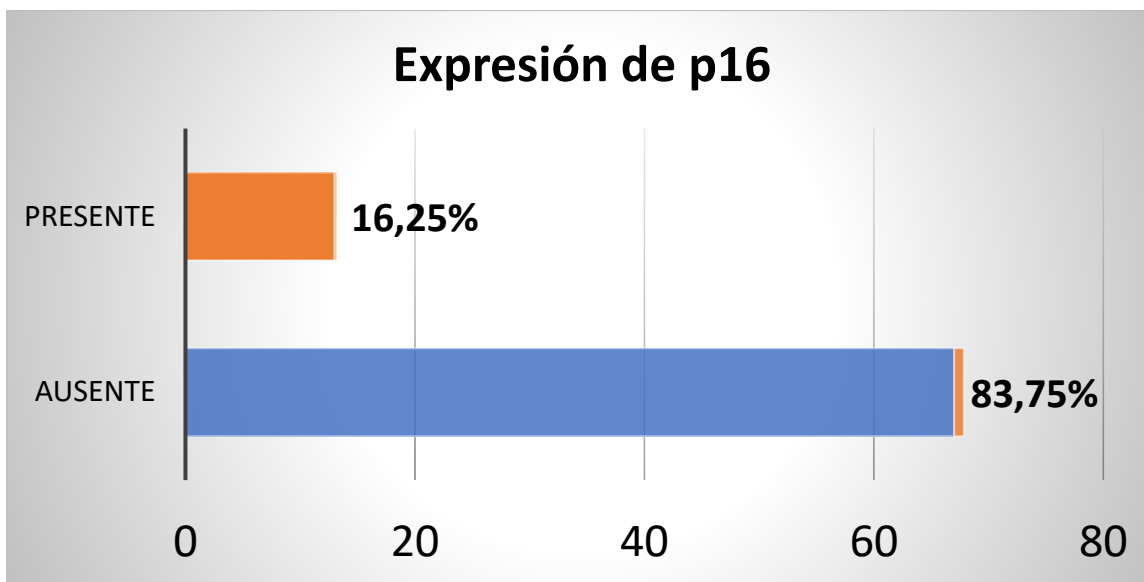
Figura 13.

Presencia de invasión perineural



Expresión de p16 en inmunohistoquímica

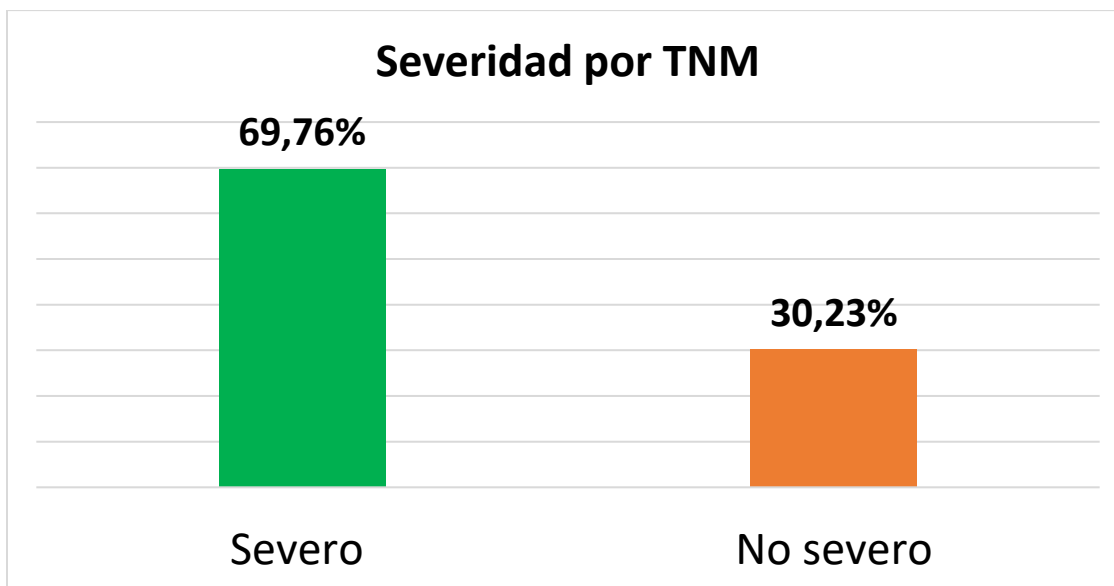
La expresión de p16 se identificó en 13 muestras evaluadas correspondiendo a un 16.25%. (Figura 14)

Figura 14.*Expresión de p16*

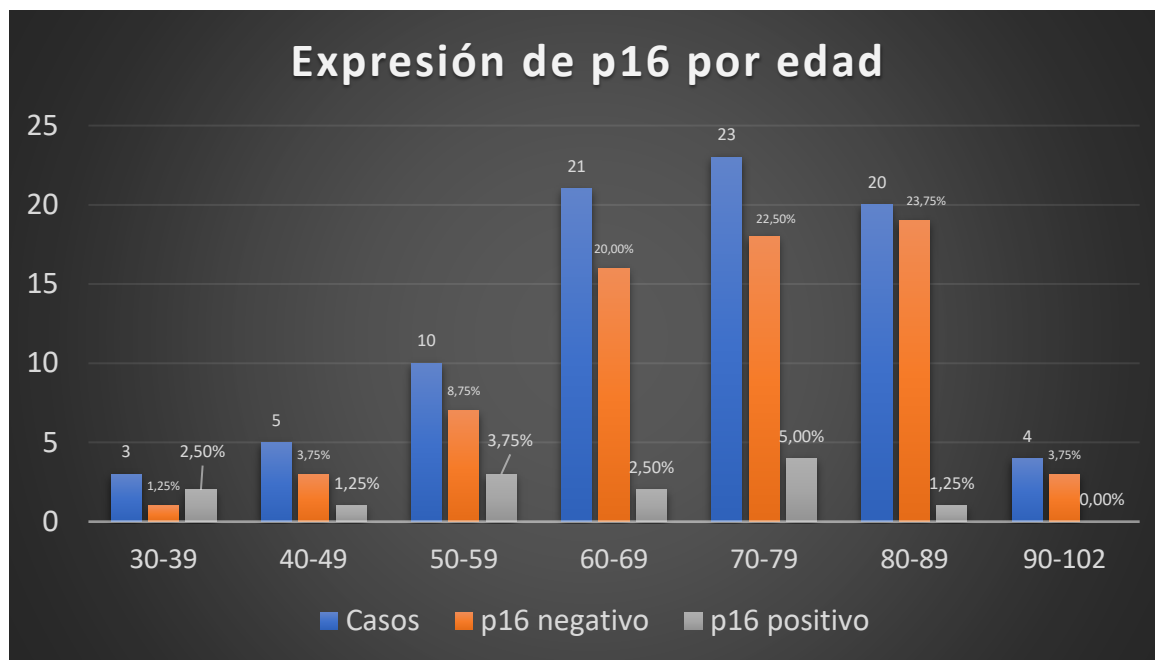
La severidad del carcinoma escamocelular se evaluó por medio de la escala TNM encontrando que 69.76% de las muestras correspondían con una clasificación de TNM de severidad con respecto al 30.23% de casos restantes cuya severidad fue menor. Además los casos con expresión de p16 presentaron mayor severidad. (Figura 15)

Figura 15.

Severidad de la neoplasia por clasificación TNM



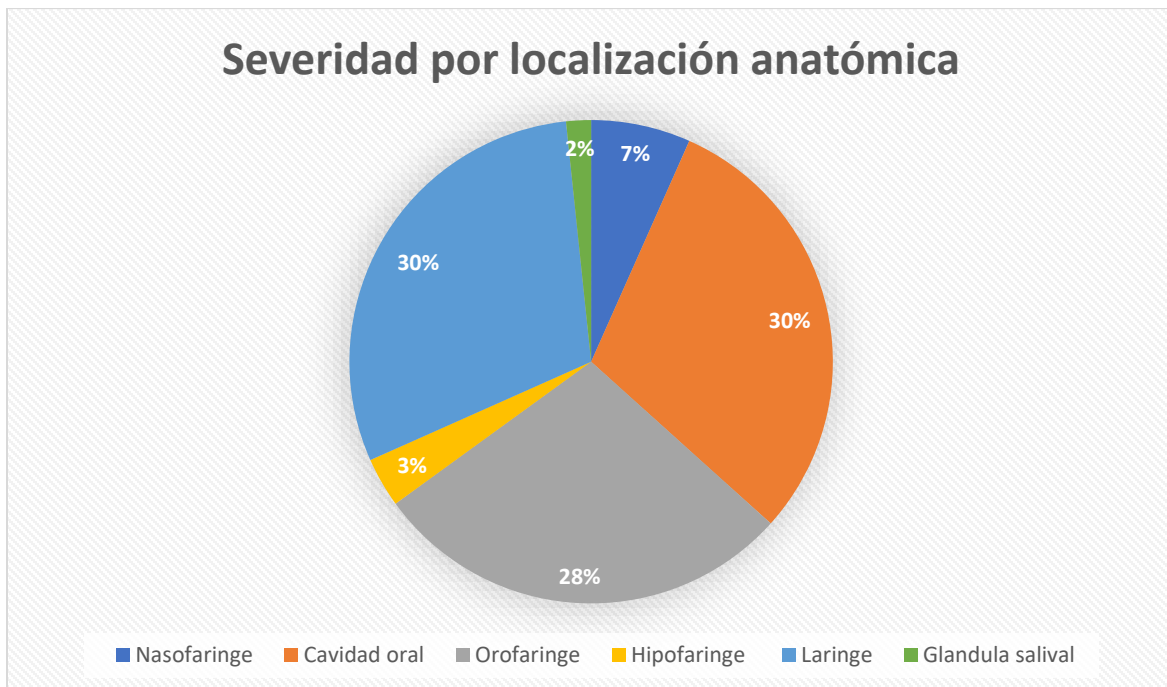
Evaluando la expresión de p16 por grupo etario, se documentó que el grupo de edad con mayor cantidad de casos positivos para p16 fue el de los casos comprendidos entre 70-79 años, por el contrario, el grupo de edad comprendido entre 90-102 años no presento expresión de p16. (Figura 16)

Figura 16.*Expresión de p16 en relación con la edad*

Se evaluó la severidad del carcinoma escamocelular por localización anatómica por medio de la escala TNM identificando que las regiones con mayor frecuencia de casos severos fueron cavidad oral y laringe con un 30% para cada una de estas localizaciones. (Figura 17)

Figura 17.

Severidad por TNM en relación a localización anatómica



Se pudo determinar que en los pacientes menores de 70 años, los tumores localizados en cavidad oral y en orofaringe, presentaron una asociación estadísticamente significativa, con mayor severidad por TNM, sugiriendo un mayor tamaño de muestra por los amplios intervalos para futuros scores de riesgo. (OR: 3.54;p=0.014 IC: 1.2981-9.7048; OR: 5.62; p=0.04 IC: 1.023-30.9036; OR:10.52; 0.01 IC: 1.4838-76.0812). (Tabla 2)

Tabla 2.*Análisis bivariado evaluando severidad*

VARIABLE	OR	P	IC95%	
Edad	0.95	0.015	0.9137-0.9905	
edad < 70	3.54	0.014	1.2981-9.7048	
Localización anatómica de la neoplasia	Cavidad oral	5.62	0.04	1.023-30.9036
	Orofaringe	10.62	0.01	1.4838-76.0812
Presencia de reacción Desmoplásica	0.20	0.009	0.0638-0.6761	
Expresión inmunohistoquímica para P16	6.27	0.087	0.7670-51.2962	

Se observó una relación estadísticamente significativa del alcoholismo y tabaquismo con el sexo masculino. (OR: 6.03; p=0.02; IC: 1.2963-28.1177; OR: 2.83; p=0.03; IC: 1.0652-7.5225). De forma contraria el sexo femenino tenía una menor probabilidad de exposición a tóxicos y la expresión de p16 sugiriendo un requerimiento de mayor tamaño de muestra para conclusiones más ajustadas. (OR: 0.28 IC: 0.0833-0.9438; OR: 0.18 IC: 0.0513-0.6332). (Tabla 3)

Tabla 3.*Análisis bivariado con diferenciación por sexo*

VARIABLE	OR	P	IC95%
Edad	1.02	0.096	0.9949-1.0640
Alcoholismo	6.03	0.022	1.2963-28.1177
Tabaquismo	2.83	0.037	1.0652-7.5225
Exposición a tóxicos	0.28	0.040	0.0833-0.9438
Expresión inmunohistoquímica para P16	0.18	0.008	0.0513-0.6332

Se encontró que los menores de 60 años y la presencia de invasión perineural se asociaron significativamente con la expresión por inmunohistoquímica de p16 (OR:0.95; p=4.36; IC: 1.2283-15.5012; OR: 14.44; p=0.004; IC: 2.3056-90.49138). Por lo contrario, el sexo femenino y la ausencia de antecedentes toxicológicos (alcoholismo y tabaquismo) tuvieron menos probabilidad de expresar p16 por inmunohistoquímica (OR: 0.18 IC: 0.0513-0.6332; OR: 0.42 IC: 0.0867-2.1055; OR: 0.12 IC: 0.0345-0.4753).

Tabla 4.

Análisis bivariado evaluando la expresión de p16

VARIABLE	OR	P	IC95%
Edad	0.95	0.02	0.9126-0.9932
Edad < 60	4.36	0.02	1.2283-15.5012
Sexo	0.18	0.008	0.0513-0.6332
Alcoholismo	0.42	0.29	0.0867-2.1055
Tabaquismo	0.12	0.002	0.0345-0.4753
Invasión perineural	14,44	0,004	2.3056-90.49138

18. Discusión y conclusiones

En nuestro estudio, teniendo en cuenta la caracterización de la población, se encontró que el sexo femenino es el de mayor afectación, con una edad media de presentación de 70 años. Aunque tradicionalmente esta patología se asocia con varones mayores, existe una incidencia creciente entre individuos más jóvenes y con un mayor porcentaje en el sexo femenino (23). A pesar de esto, en la literatura sigue predominando el sexo masculino como la mayor población afectada (22, 24). Además, la edad de presentación de estos carcinomas asociados a VPH es principalmente en pacientes jóvenes y usualmente menores de 45 años (22), contrario a lo observado en nuestros resultados dado que el grupo etario con mayor afectación fue entre los 70 a 79 años.

El consumo de tabaco y alcohol son los factores de riesgo más significativos identificados en estos carcinomas, atribuyéndose un impacto en el 75% de las situaciones, con un efecto sinérgico cuando se combinan (7, 22). Según lo obtenido en nuestro estudio, el factor de riesgo de mayor impacto sigue siendo el consumo de tabaco concordante con la evidencia y aunque si se documentó consumo de alcohol y exposición a otros tóxicos en la población, estos no fueron tan representativos como el tabaquismo.

El sitio anatómico reportado en la OMS para neoplasias asociadas a VPH son las tonsilas palatinas y linguales a nivel de la orofaringe. Por otra parte, los carcinomas asociados a tabaquismo y no relacionados con VPH comprometen en su mayoría la cavidad oral, hipofaringe y laringe (6,15). En la población analizada se pudo establecer que el sitio más comprometido por el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello fue la laringe, sin embargo, teniendo en cuenta la

expresión de p16 la localización más frecuentemente comprometida es la orofaringe y cavidad oral.

En cuanto a severidad medida por TNM según localización anatómica, la evidencia ha mostrado que aquellos carcinomas que se ubican en regiones superiores y anteriores (cavidad oral) y con enfermedad local (estadios I y II) tienen mejores desenlaces clínicos en comparación a aquellas neoplasias localmente avanzadas y una ubicación inferior y posterior (25). Además, la presencia de características microscópicas como invasión perineural, linfovascular y un grado histológico elevado confieren peor pronóstico (2). Los resultados encontrados en el presente estudio presentan concordancia con lo anteriormente descrito, pues los casos de mayor severidad medida por la clasificación de TNM fueron aquellos de localización en laringe, sin embargo, también se documentó casos de severidad para neoplasias localizadas en cavidad oral, que pudieran ser explicados por tamaño tumoral y compromiso ganglionar metastásico. Cabe resaltar que la presencia de invasión perineural, linfovascular y la necrosis tumoral, no fueron características frecuentes en las muestras evaluadas.

Por otra parte, se identificó que la severidad en relación al género, es mayor en el sexo masculino, hallazgos similares a los datos presentados en la epidemiología global, tal como se describe en Carcamo y colaboradores (26). No obstante, en lo concerniente a severidad evaluada por edad, se encontró que, en casos menores de 70 años, estos presentan mayor asociación a estadios avanzados, una relación que fue estadísticamente significativa en nuestro trabajo, a pesar de que esto es contrario a lo descrito por la literatura (26, 27).

Cabe aclarar que, debido a la limitación del tamaño de muestra, los datos descritos pueden estar sujetos a sesgos de confusión, ya que los casos con expresión de p16 (92%) presentaban mayor severidad por TNM, hallazgo que no podría ser extrapolable a la población general, pues la

evidencia demuestra que los carcinomas escamocelulares asociados a VPH evaluado por la expresión de p16, tiene mejores resultados de supervivencia, comparados con los no asociados a VPH (2).

Adicionalmente es sabido que los carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello asociados a VPH son usualmente pobremente diferenciados o indiferenciados, pese a esto los casos que presentaron expresión de p16 fueron principalmente moderadamente diferenciados (28).

En otro orden de ideas, teniendo en cuenta los objetivos específicos de este trabajo, en los que se planteó definir la variante histopatológica de carcinoma escamocelular más prevalente, este no se pudo establecer, debido a la ausencia del reporte de esta característica en los informes del estudio histopatológico contenidos en las bases de datos del departamento de patología.

Para finalizar es de resaltar que no se pudo determinar asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p16 por inmunohistoquímica y la severidad del carcinoma evaluada por TNM, no obstante, sería recomendable para próximos análisis un mayor tamaño de muestra para lograr mejor poder estadístico, asociado a esto se puede concluir que a pesar de que se documentó mayor prevalencia del sexo femenino para este tipo de carcinomas, no hubo asociación significativa con la edad. Los sitios anatómicos que se asociaron con mayor severidad fueron aquellos localizados en cavidad oral y orofaringe, aunque se sugieren trabajos con mayor tamaño de muestra tipo multicéntrico. Dentro del apartado de las características histopatológicas, la ausencia de reacción desmoplásica se destacó como la de mayor probabilidad de no estar relacionado con severidad, además es necesario un mayor tamaño de muestra para determinar la asociación de la invasión linfovascular como factor de riesgo de severidad dado su plausibilidad biológica.

19. Compromisos por Parte del Equipo Investigador

Los investigadores desarrolladores del presente proyecto de investigación se comprometieron a la divulgación de los resultados que se logren obtener en esta investigación, los cuales fueron socializados en el evento nacional “V SIMPOSIO REGIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS” llevado a cabo en Bucaramanga los días 12 Y 13 de septiembre del 2024.

20. Conformación y Trayectoria del Grupo de Investigación

Los investigadores que participan en el presente estudio son miembros de la Universidad industrial de Santander (UIS) y se encuentran avalados por el Grupo de Investigación de Patología Estructural, Funcional y Clínica de la Universidad Industrial de Santander (PAT-UIS). El grupo actualmente es reconocido por Colciencias. Los investigadores que hacen parte de este proyecto no tienen conflicto de interés que interfiera con la ejecución y posterior socialización de este trabajo de investigación.

Referencias bibliográficas

1. López, A. F.; Sanabria Quiroga, Álvaro E. Características clínicas Y Administrativas Que Se Relacionan Con El Retraso En El diagnóstico Y Tratamiento De Los Pacientes Con cáncer De Cabeza Y Cuello. *Rev Colomb Cir* 2020, 35, 66-74.
2. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours (WHO classification of tumours series, 5th ed. vol. 9). Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2022.
3. McDermott, J. D., & Bowles, D. W. (2019). Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Current treatment options in oncology*, 20(5), 43. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0650-5>.
4. Ospina, M. L., Huertas, J. A., Montaña, J. I., & Rivillas, J. C. (2015). Observatorio nacional de cáncer Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 33(2), 262-276.
5. Cantrell, S. C., Peck, B. W., Li, G., Wei, Q., Sturgis, E. M., & Ginsberg, L. E. (2013). Differences in imaging characteristics of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancers: a blinded matched-pair analysis. *American Journal of Neuroradiology*, 34(10), 2005-2009.
6. Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.
7. Cardemil M, Felipe. (2014). EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO. *Revista chilena de cirugía*, 66(6), 614-620. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262014000600017>

8. Montero, Pablo. (2018). Cáncer de Cabeza y Cuello asociado a Virus Papiloma Humano: Prevención, diagnóstico y tratamiento. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 29. 419-426. 10.1016/j.rmclc.2018.07.001.
9. Rebolledo Cobos, M., Arango Fernández, H., Rebolledo Cobos, R., & Alonso Brujes, I.. (2016). Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. *Avances en Odontoestomatología*, 32(3), 135-144.
10. Khalid, M. B., Ting, P., Pai, A., Russo, J. L., Bakst, R., Chai, R. L., ... & Miles, B. A. (2019). Initial presentation of human papillomavirus-related head and neck cancer: A retrospective review. *The Laryngoscope*, 129(4), 877-882.
11. Bagan, J., Sarrion, G., & Jimenez, Y. (2010). Oral cancer: clinical features. *Oral oncology*, 46(6), 414-417.
12. Valls-Ontañón, Adaia & Hernández-Losa, Javier & Haro, Rosa & Bellosillo-Paricio, Beatriz & Ramon y Cajal, Santiago & Bescos, Coro & Munill-Ferrer, Montserrat & Alberola-Ferranti, Margarita. (2018). Impacto del virus papiloma humano en pacientes afectos de carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe. *Medicina Clínica*. 152. 10.1016/j.medcli.2018.05.015.
13. Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S. J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., & Klußmann, J. P. (2018). HPV - A different view on Head and Neck Cancer. HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. *Laryngo- rhino- otologie*, 97(S 01), S48–S113. <https://doi.org/10.1055/s-0043-121596>.
14. Paver, E. C., Currie, A. M., Gupta, R., & Dahlstrom, J. E. (2020). Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and

- detection of HPV. *Pathology*, 52(2), 179–191.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.10.008>.
15. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours (WHO classification of tumours series, 5th ed. vol. 9). Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2022.
16. Sichero, L., Tagliabue, M., Mota, G., Ferreira, S., Nunes, R., Castañeda, C. A., Castillo, M., Correa, R. M., Perdomo, S., Rodríguez-Urrego, P. A., Matos, L. L., Mohssen, A., Gheit, T., Tommasino, M., Chiocca, S., Villa, L. L., & HEADLAcE Study Group (2022). Biomarkers of human papillomavirus (HPV)-driven head and neck cancer in Latin America and Europe study: Study design and HPV DNA/p16INK4a status. *Head & neck*, 44(1), 122–133. <https://doi.org/10.1002/hed.26912>.
17. Khalid, M. B., Ting, P., Pai, A., Russo, J. L., Bakst, R., Chai, R. L., ... & Miles, B. A. (2019). Initial presentation of human papillomavirus-related head and neck cancer: A retrospective review. *The Laryngoscope*, 129(4), 877-882.
18. Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25.
19. Lewis, J. S., Jr, Chernock, R. D., Ma, X. J., Flanagan, J. J., Luo, Y., Gao, G., Wang, X., & El-Mofty, S. K. (2012). Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 25(9), 1212–1220. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.79>.

20. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas. College of American Pathologists. (n.d.). Retrieved October 9, 2022, from <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cap-guidelines/current-cap-guidelines/human-papillomavirus-testing-in-head-and-neck-carcinomas>.
21. Wang, H., Zhang, Y., Bai, W., Wang, B., Wei, J., Ji, R., Xin, Y., Dong, L., & Jiang, X. (2020). Feasibility of Immunohistochemical p16 Staining in the Diagnosis of Human Papillomavirus Infection in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*, 10, 524928. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.524928>.
22. Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Saginala K, Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)*. 2023 Jun 13;11(2):42. doi: 10.3390/medsci11020042. PMID: 37367741; PMCID: PMC10304137.
23. León X, López M, García J, Montserrat JR, Gras JR, Kolanczak KA, Quer M. Epidemiologic characteristics of squamous head and neck carcinoma patients. Results of a hospital register. *Acta Otorrinolaringol Esp (Engl Ed)*. 2019 Sep-Oct;70(5):272-278. English, Spanish. doi: 10.1016/j.otorri.2018.05.006. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30086888.
24. Arsa, L., Siripoon, T., Trachu, N., Foyhirun, S., Pangpunyakulchai, D., Sanpapat, S., Jinawath, N., Pattaranutaporn, P., Jinawath, A., & Ngamphaiboon, N. (2021). Discrepancy in p16 expression in patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma in Thailand: clinical characteristics and survival outcomes. *BMC cancer*, 21(1), 504. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08213-9>.
25. Su WW, Su CW, Chang DC, Chuang SL, Chen SL, Hsu CY, Yen AM, Chiu SY, Fann JC, Lee YH, Jeng YC, Lee YC, Chiu HM, Chen TH, Wang CP, Chen MK. Impact of varying

- anatomic sites on advanced stage and survival of oral cancer: 9-year prospective cohort of 27 717 cases. *Head Neck*. 2019 May;41(5):1475-1483. doi: 10.1002/hed.25579. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30652378.
26. Cárcamo, M. (2018). Epidemiología y generalidades del tumor de cabeza y cuello. *Revista médica clínica las condes*, 29(4), 388-396.
27. Ng, J. H., Iyer, N. G., Tan, M. H., & Edgren, G. (2017). Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. *Head & neck*, 39(2), 297-304.
28. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol*. 2012 Jul;6 Suppl 1(Suppl 1):S48-54. doi: 10.1007/s12105-012-0371-6. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22782223; PMCID: PMC3394160.

Anexos**Anexo 1. Instrumentos Recolección de variables**

Edad	
------	--

Género	M	F
--------	---	---

Tabaquismo	Si	No
------------	----	----

Consumo de alcohol	Si	No
--------------------	----	----

Exposición ocupacional a tóxicos	Si	No	Cual:
----------------------------------	----	----	-------

Localización anatómica de la neoplasia	Nasofaringe	
	Cavidad oral (mucosa bucal, paladar duro, lengua anterior, piso de la boca y trígono retromolar)	

	Orofaringe (tonsilas palatinas, tonsilas linguales, base de la lengua, paladar blando, úvula y pared posterior de la faringe)	
	Hipofaringe (parte inferior de la garganta que se extiende del hioides al cartílago cricoides)	
	Laringe	

Variante de carcinoma escamocelular	Basaloide	
	Células fusiformes	
	Adenoescamoso	
	Verrucoso	
	Carcinoma cuniculado	
	Lifoepitelial	
	Papilar	
	Acantolítico	

Estadía TNM	T:	Ganglios linfáticos regionales (N):	Metástasis a distancia (M):
	T0: No hay prueba de tumor primario	N0: No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales	Mx: no se pueden evaluar las metástasis a distancia
	Tis: Carcinoma in situ	N1: Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral menor o igual a 3 cm	M0: no hay metástasis a distancia
	T1: Tumor de 2 o menos cm en diámetro mayor	N2: metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral >3cm pero ≤6cm de dimensión mayor; o en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales	M1: hay metástasis a distancia
	T2: Tumor mayor o igual a 2 cm pero menor o igual a 4 cm en diámetro mayor	Todos	
	T3: Tumor mayor a 4 cm en dimensión mayor	≤6cm de dimensión mayor; o en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales todos ≤6cm	

		<p>N2a: metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral >3cm pero ≤6m de dimensión mayor</p>	
		<p>N2b: metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales todos ≤6cm de dimensión mayor</p>	
		<p>N2c: metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales todos ≤6cm</p>	
		<p>N3: metástasis en un ganglio linfático >6cm de diámetro</p>	
Necrosis tumoral	Presente	Ausente	
Reacción desmoplásica	Presente	Ausente	
Invasión vascular	Presente	Ausente	
Invasión perineural	Presente	Ausente	