

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“EXPRESION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y  
VIRUS DE EPSTEIN BARR EN CARCINOMAS SINONASALES  
Y PAPILOMA NASAL INVERTIDO”

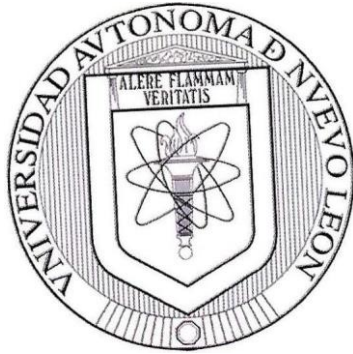
POR:

DR. LUIS CARLOS CANALES MARTINEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE ESPECIALISTA EN ANATOMIA  
PATOLOGICA

FEBRERO 2016


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
HOSPITAL UNIVERSITARIO  
"DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLES"



SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA TESIS COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"EXPRESION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y VIRUS DE EPSTEIN  
BARREN CARCINOMAS SINONASALES Y PAPILOMA NASAL INVERTIDO"

PRESENTADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. LUIS CARLOS CANALES MARTINEZ

  
\_\_\_\_\_  
DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS ANGEL CECENAS FALCON

  
\_\_\_\_\_  
CO-DIRECTOR DE TESIS  
DRA. NATALIA VILCHES CISNEROS

**APROBACION DE LA TESIS:**

**Aprobación de la tesis:**



**Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón**  
**Director de la tesis**



**Dra. Natalia Vilches Cisneros**  
**Co-director de la tesis**



**Dr. med. Raquel Garza Guajardo**  
**Coordinador de Enseñanza**



**Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez**  
**Coordinador de Investigación**



**Dra. med. Oralia Barboza Quintana**  
**Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología**



**Dr. med. Raquel Garza Guajardo**  
**Subdirectora de Estudios de Posgrado**

5.

"EXPRESIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y VIRUS DE  
EPSTEIN BARREN CARCINOMAS SINONASALES Y PAPILOMA NASAL  
INVERTIDO"

Presentado por

Dr. Luis Carlos Canales Martínez

Este trabajo se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología  
del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" bajo la dirección del  
Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón y la co-dirección de la Dra. Natalia Vilches  
Cisneros



---

**Dr. Med. Oralía Barboza Quintana**

Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Oralia Barbaza y a la Dra. Raquel Garza por su confianza y la oportunidad de ingresar en esta institución; por su apoyo y su guía en nuestra formación.

Al Dr. Luis Ángel Ceceñas quien me dirigió personalmente en esta tesis y se mantuvo al tanto de su progreso. Por su esfuerzo y trabajo en ella, su apoyo incondicional, por su guía como maestro y por ser siempre un apoyo invaluable.

A la Dra. Natalia Vilches por su participación en esta tesis y por todas sus enseñanzas

A mi esposa Marce, por su eterna comprensión, compañía, y motivación para ser siempre mejor.

A mis padres por guiar mi formación como ser humano, por su amor y fortaleza para convertirme en lo que hoy soy y en lo que sueño convertirme.

Por los valores

A mis compañeros residentes con quienes compartí esta etapa, gracias por su amistad, por su confianza y por ser parte de este camino que juntos recorrimos.

Finalmente a todas aquellas personas que a lo largo de mi carrera contribuyeron en mi formación, a todo el personal del departamento de Anatomía Patológica, las secretarías y las técnicas que se convirtieron también en amigos y a cada persona que me acompañó en este recorrido.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
Capítulo I	
1. RESÚMEN ..... 8	8
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN ..... 9	9
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS ..... 24	24
Capítulo IV	
4. JUSTIFICACIÓN ..... 25	25
Capítulo V	
5. OBJETIVOS. .... 26	26
Capítulo VI	
6. MATERIAL Y MÉTODOS. .... 27	27
Capítulo VII	
7. RESULTADOS ..... 37	37
Capítulo VIII	
8. DISCUSIÓN. .... 41	41

8.

Capítulo IX

9. CONCLUSION ..... 45

Capítulo X

10.BIBLIOGRAFÍA..... 50

## **CAPITULO 1**

### **1. RESUMEN**

**Luis Carlos Canales Martínez**

**Fecha de graduación: Febrero 2016**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: EXPRESIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y  
VIRUS DE EPSTEIN BARREN CARCINOMAS SINONASALES Y PAPILOMA  
NASAL INVERTIDO**

**Número de páginas: 51**

**Candidato para obtener el grado de especialista en Anatomía Patológica**

**Área de estudio: Anatomía Patológica**

**Propósito y Método de Estudio:** Los papilomas nasales invertidos y carcinomas sinonasales son neoplasias frecuentes de los senos paranasales. El rol del virus del papiloma humano y virus de Epstein Barren su etiología no ha sido estudiado. Estos podrían ser utilizados posteriormente en el desarrollo de protocolos que establezcan su utilidad en el pronóstico y tratamiento de estas entidades. En el presente trabajo se analizaron 35 casos de papilomas nasales invertidos y 23 casos de carcinomas sinonasales y se estudió la presencia de los

virus por inrnuohistoquímica y PCR.

**Contribuciones y conclusiones:** Se demostró la presencia tanto por inrnuohistoquímica como por PCR entre los papilomas nasales invertidos y los carcinomas sinonasales. La relación de su expresión entre papilomas y carcinomas no fue estadísticamente significativo. El significado de esta diferencia de expresión es incierto. Considerarnos que los hallazgos encontrados en este estudio son importantes y esperarnos que sean un paso que permita el desarrollo de nuevos estudios que traten de establecer el significado pronóstico y terapéutico que la expresión de estos virus pueda tener.

**FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS:** \_\_\_\_\_

## CAPITULO 11

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Senos paranasales

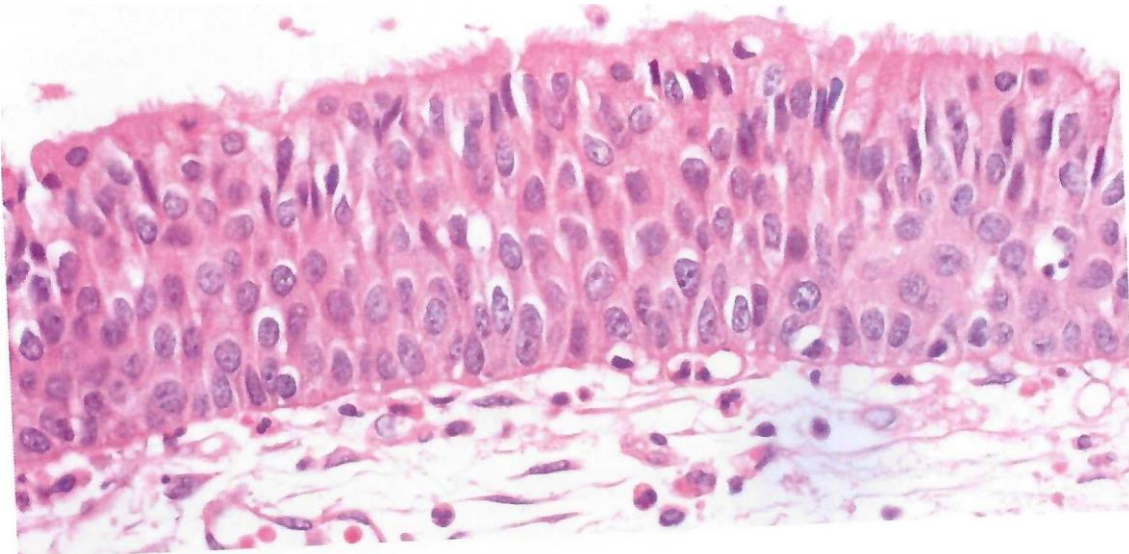
La cavidad nasal y los **senos paranasales** forman una unidad funcional que se ve reflejada en su similitud de los procesos patológicos que involucran a toda la región. Esta se localiza en la porción media de la cara, y se compone de un par de cavidades nasales centrales rodeadas por los senos paranasales. La cavidad nasal cuenta con un piso, techo, pared lateral y septo. Se divide de manera anterior hacia el vestíbulo nasal y hacia posterior como antro nasal como cornetes. El vestíbulo nasal tiene como borde inferior al proceso palatino maxilar y como borde medial al cartílago septal. Las paredes superiores y laterales se componen por los tejidos blandos de la ala nasal.

Los senos paranasales comprenden los senos maxilares, frontales etmoidales y esfenoidales. El laberinto etmoidal del adulto tiene relación estrecha con la órbita, y su pared medial forma la pared lateral nasal. Debido a la proximidad de los pasajes nasales y senos, el seno etmoidal es el segundo más frecuentemente involucrado por extensión tumoral, después del seno maxilar. El seno maxilar es el seno más grande e involucra la mayoría del cuerpo de la maxila. Las paredes que se encuentran en contacto con la cavidad nasal y la órbita son muy delgadas, mientras que aquellas anteriores y posteriores son anchas <sup>1</sup>

El tejido blando que reviste al vestíbulo es extensión de la piel, con epitelio escamoso estratificado queratinizante. Este recubrimiento se extiende por 1 a 2 cms desde el límite nasal externo hacia las narinas. Posterior a este se encuentra la unión mucocutánea, límite donde comienza

10.

la mucosa respiratoria de origen ectodérmico, conocida también como **membrana schneideriana**. Esta reviste al antro nasal, cornetes y senos paranasales. Los cornetes cuelgan hacia la luz nasal a lo largo de las paredes laterales de la cavidad nasal. <sup>1</sup>



**Ilustración 1 Membrana schneideriana (40x)**

Los dos tipos principales de epitelios que recubren a la región son el epitelio escamosos estratificado y el epitelio respiratorio pseudoestratificado columnar. La interfase entre ellos es segmentada; por áreas es de manera abrupta, y en otras involucra un epitelio transicional intermedio. <sup>2</sup>

## **2.2 Papilomas sinonasales**

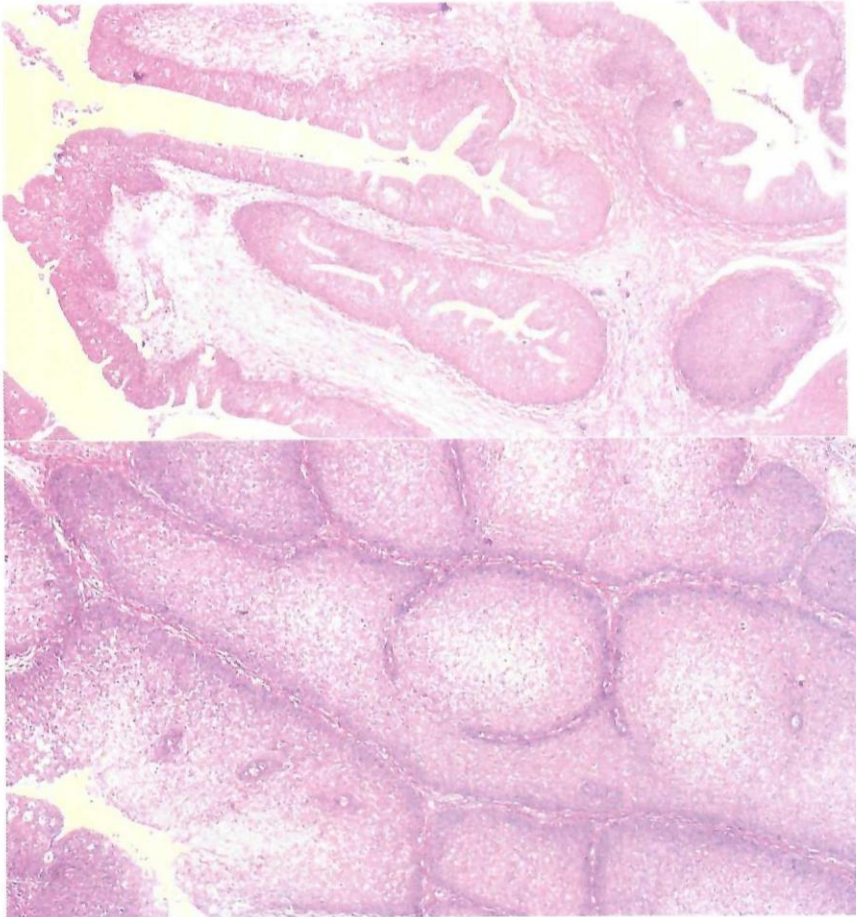
Los **papilomas sinonasales** o schneiderianos son neoplasias benignas de la mucosa respiratoria o schneideriana que recubre a la cavidad nasal y los senos paranasales. Son pequeños, de color gris, rosa o blanco, de crecimiento polipoide. Tienden a medir menos de dos centímetros, siendo asintomáticos, pero también debutan con síntomas de obstrucción nasal o epistaxis. La mayoría de los casos se observan en adultos de la tercera

11.

década en adelante, pero pueden ocurrir en niños también<sup>3</sup>. No suele existir historia clínica precedente de sinusitis crónica o procedimientos quirúrgicos.<sup>4</sup>

Se han clasificado dependiendo de su apariencia o composición mayoritaria, en tres grandes grupos: fungiformes (también llamados exofíticos, evertidos, o papilomatosis), invertidos (escamosos, transicionales (sternberg), y de células cilíndricas (oncocítico). Se excluyen de este grupo los papilomas escamosos hiperqueratósicos verrucosos que tienen un origen en el epitelio escamoso estratificado del vestíbulo nasal, por ser análogo a aquellos tumores que aparecen en la piel. En contraste con los pólipos inflamatorios, los papilomas sinonasales son unilaterales en la mayoría de los casos.<sup>5</sup>

Microscópicamente los papilomas son exofíticos, con tallos fibrovasculares arborizantes delicados cubiertos por múltiples capas de epitelio escamoso. La superficie del pólipo esta revestida por un epitelio escamoso no queratinizante ancho también conocido como epitelio transicional. Puede observarse además una mezcla de células mucinosas y microquistes mucinosos intraepiteliales y menos frecuente epitelio respiratorio ciliado con algunas células caliciformes dentro de las formaciones epiteliales.<sup>67</sup> Todos los tipos epiteliales pueden estar presentes en un solo papiloma.



**Ilustración 2 Papiloma nasal invertido ( 5x, 10xJ**

Los tipos celulares presentes en los papilomas fungiformes e invertidos son idénticos, pero ambos difieren arquitecturalmente, en su sitio de origen, y en su asociación con carcinoma. El papiloma fungiforme tiene un origen casi exclusivo en el septo nasal, mientras la forma invertida afecta predominantemente la pared lateral de la nariz y los senos paranasales. Los papilomas fungiformes tienen tallos de tejido conectivo que forman una arquitectura exofítica; por el otro lado, el papiloma invertido tiene invaginaciones del epitelio de superficie hacia el estroma subyacente (de cualquier manera, algunos papilomas invertidos tienen una superficie exofítica además de las invaginaciones, y algunos fungiformes pueden tener invaginaciones esporádicas). La queratinización abundante es poco común en el papiloma nasal invertido, y si se encuentra presente se debe de

13.

investigar algún diagnóstico alternativo, especialmente de carcinoma escamoso<sup>4</sup>. Por último, el papiloma fungiforme no se asocia a carcinoma, mientras que el papiloma invertido sí<sup>8</sup>.

El pleomorfismo nuclear es prominente en aproximadamente 10% de los papilomas invertidos, casi siempre en forma de pocas células aisladas. Estos núcleos atípicos tienen a formar agregados en el tercio interno de la mucosa. Pueden encontrarse neutrófilos a través de la capa epitelial como células únicas o micro abscesos. Esta inflamación, aunado a las irregularidades nucleares, pueden otorgar una apariencia histológica de malignidad. Al contrario, el carcinoma tiene anormalidades nucleares severas y extensas<sup>8</sup>.

Los papilomas de células cilíndricas o papiloma oncocítico es el papiloma menos común y por lo tanto el menos estudiado. Se encuentra recubierto por células hinchadas, eosinofílicas y con citoplasma granular<sup>9</sup>. Se pueden encontrar mitosis ocasionales en la capa basal. La atipia es de leve a moderada, y existe un patrón de maduración ordenado. Las células tumorales son capaces de sintetizar un componente secretor y de formar IgA e IgM<sup>10</sup>. La composición dual de células columnares y escamosas es también aparente en el nivel de inmunohistoquímica, en el sentido que existe una expresión de queratina correspondiente a ambos tipos celulares<sup>11</sup>.

Los papilomas pueden desarrollarse en el septo nasal anterior, vestíbulo y cornete nasal inferior. Aquellos que tienen origen en el septo nasal son usualmente exofíticos y fungiformes, con un núcleo central de tejido conectivo. Aquellos localizados en la pared lateral (meato medio o cornete inferior) son del tipo invertido, con un crecimiento interno del epitelio hacia el estroma<sup>12</sup>. Esta característica puede ser mal interpretada como invasión y realizarse un diagnóstico incorrecto de carcinoma.

El potencial para la transformación maligna existe en todos los subtipos de papiloma, incluyendo aquellos compuestos de epitelio oncocítico<sup>13</sup>. Para realizar un diagnóstico definitivo de una lesión papilar escamosa, especialmente una con displasia, se debe de estudiar la lesión completa<sup>4</sup>. El desarrollo de carcinoma puede ser meses o años después de la excisión de un papiloma<sup>14-15</sup>. Este evento ocurre en el 3% de los papilomas y se asocia con un índice de supervivencia del 25%. Es posible además contar con la presencia de carcinoma focal invasor en un papiloma típico en el tiempo de la primer excisión<sup>16, 17</sup>. Esta complicación se observa en el 3% de los casos, y se asocia a un pronóstico excelente<sup>18</sup>. Por último, podemos ver la aparición de un tumor con un patrón de crecimiento muy similar al papiloma pero con características citológicas sutiles que indican malignidad<sup>6</sup>. La supervivencia de este grupo es similar a la del carcinoma que se desarrolla posterior a la escisión de un papiloma (25%)

Existen numerosos estudios realizados con hibridación in situ o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demostrando la presencia de virus del papiloma humano en papilomas sinonasales.

El tratamiento para los papilomas sinonasales es la remoción quirúrgica. La realización de TAC se utiliza de manera rutinaria en la planeación del manejo<sup>19</sup>. La tasa de recurrencia para los papilomas históricamente se coloca dentro del rango de 4 a 74%, con una cantidad importante de pacientes con historia de recurrencias múltiples. Universalmente se ha aceptado que sea el resultado de excisión incompleta, ya que los papilomas tienen la tendencia de expandirse a lo largo de la mucosa respiratoria a través de metaplasia escamosa o cilíndrica. Una resección conservadora, como una polipectomía, no elimina a la enfermedad microscópica y se ha asociado a tasas de recurrencias altas. La tasa de recurrencia para los papilomas ha sido reducida a aproximadamente 5% con la rinotomía lateral y maxolectomía media<sup>20</sup>. Se ha manejado además la idea de que los

14.

papilomas sinonasales recidivantes probablemente tengan una carga viral de VPH mayor a los no recidivantes, o que la recidiva puede ser el resultado de la reactivación de infección por VPH latente en la mucosa adyacente<sup>21</sup>.

Dentro del diagnóstico diferencial de los papilomas schneiderianos deben de considerarse varias entidades. La primera y más obvia son los pólipos inflamatorios. Aunque estos pueden tener metaplasia escamosa, no tienen el epitelio escamoso no queratinizante de los papilomas. El diagnóstico diferencial debe incluir además del carcinoma escamoso. El grado de atipia visto en carcinomas no se encuentra en los papilomas, además de nidos invasores y estroma desmoplásico<sup>1</sup>.

El pronóstico de los papilomas schneiderianos de todos los tipos histológicos sin la presencia de carcinoma invasor es excelente. La tasa de recurrencia depende del enfoque de la cirugía inicial. No se han reportado muertes causadas por un papiloma. El carcinoma invasor aparece en aproximadamente 5 a 14 % de los pacientes con papilomas sinonasales<sup>1</sup>. Esta complicación se ve exclusivamente en los papilomas de tipo invertido. Como ya se ha mencionado, el carcinoma puede verse como parte de un papiloma, o se puede presentar como una recurrencia posterior a una resección de una lesión benigna. La mayoría de los carcinomas son de tipo escamoso. No existen características histológicas que predigan recurrencias o transformación maligna.

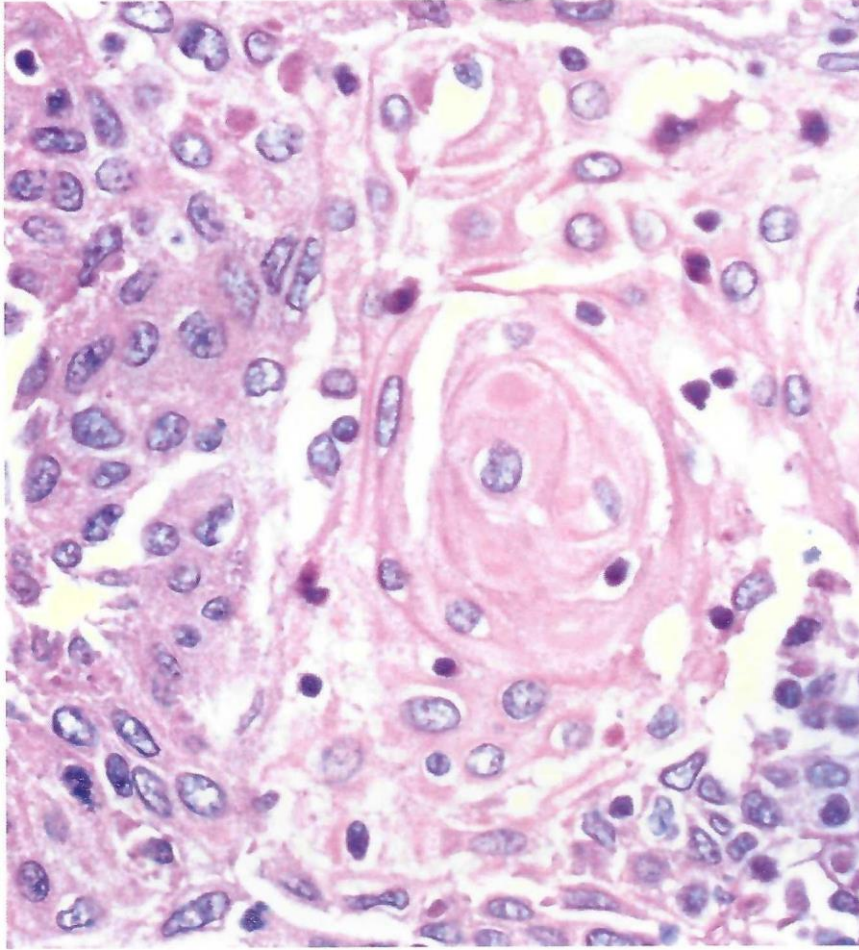
### **2.3 Carcinomas sinonasales**

El **carcinoma sinonasal** es un tumor poco usual, responsable del 0.2 al 0.8% de las muertes por cáncer en los estados unidos<sup>29</sup>. Uno de los grupos ocupacionales que se sabe tienen cierto riesgo elevado son los trabajadores del níquel<sup>23</sup>. La edad de aparición es alrededor de la sexta década.

El sitio mayormente afectado es el seno maxilar (55-60%), seguido de la cavidad nasal (19-35%), seno etmoidal (9-15%), vestíbulo nasal (4%) y senos frontal y esfenoidal (1%). Se ha notado una preponderancia por el lado izquierdo para los tumores etmoidales, lo cual sugiere una patogénesis exógena<sup>24</sup>.

Virtualmente cualquier condición del tracto sinonasal y nasofaringe puede manifestarse como obstrucción nasal y epistaxis, pero síntomas como dolor o síntomas neurológicos siempre levantan sospechas de malignidad. Los carcinomas en el seno etmoidal o cavidad nasal se presentan con obstrucción nasal, anosmia, epistaxis, gajo purulento, ensanchamiento del dorso nasal, y dolor retroorbital. Desafortunadamente, este carcinoma tiende a ser silente, o tener síntomas poco específicos, y por lo tanto se presenta de manera tardía como tumores en estadio T4 con destrucción ósea y síntomas y signos realmente alarmantes (ulceración del paladar, dolor dental, asimetría facial, proptosis). Es común la extensión a la base del cráneo o involucro esfenoidal posterior, son sus síntomas correspondientes.

El subtipo más común de carcinoma sinonasal es el carcinoma de células escamosas, representando aproximadamente el 65%<sup>1</sup>. Este es un tumor epitelial maligno caracterizado por la formación de queratina o la presencia de puentes intercelulares o ambos. La mayoría de los casos son lesiones de alto grado, con varios grados de queratinización. La histología del carcinoma escamoso aplica para todos los sitios del tracto sinonasal. El carcinoma escamoso puede variar dramáticamente de apariencia morfológica con el grado de diferenciación además de áreas glandulares, células caliciformes, componentes ductales o mioepiteliales, áreas sarcomatosas, etc. La queratinización no está confinada al carcinoma bien diferenciado, ya que puede verse en todos los grados. La queratinización individual puede verse dentro del citoplasma celular como abundante material fibrilar brillante<sup>4</sup>.



**Ilustración 3** Diferenciación escamosa en carcinoma sinonasal

A pesar de todas las variables histológicas que estos tumores pueden presentar el factor pronóstico más importante sigue siendo el tamaño tumoral y por consiguiente su estadía clínica. Por lo mismo, existen autores que critican el ensañamiento en tratar de identificar las características histomorfológicas específicas, y si estas añaden algo de relevancia al pronóstico más allá de un nivel estadístico<sup>1</sup>.

Las metástasis regional de neoplasias sinonasales son poco comunes, llegando al 9-14%. Las metástasis de estos tumores usualmente se ven en forma de extensión a tejidos blandos vecinos, como mejillas, paladar blando o piel. El seno maxilar drena de manera primaria hacia la cadena ganglionar submandibular, y el seno etmoidal hacia la cadena cervical superior<sup>1</sup>.

El tratamiento para el carcinoma sinonasal se basa en la cirugía y la radioterapia, además de radioterapia profiláctica cervical bilateral. Estos carcinomas tienden a ser infiltrantes y se pueden extender hacia el domo nasal y el labio, o también hacia órbita o placa cribiforme. La tasa de metástasis a ganglios linfáticos cervicales en la presentación es de 10 a 30%. La falla de enfermedad es locoregional. Las metástasis a distancia son poco comunes. La mayoría de los pacientes fallecen por extensión tumoral hacia la base del cráneo y el cerebro<sup>4</sup>. La probabilidad de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente 50%. Dentro de la cavidad nasal, las malignidades de el vestíbulo nasal y septum tienen mejor pronóstico, probablemente unido a su diagnóstico temprano.

Los factores causativos para el desarrollo de carcinoma sinonasal no son entendidos del todo. El polvo de madera y otras exposiciones ocupacionales se han sido reconocidos como factores de riesgo, pero solamente para un subtipo raro, el adenocarcinoma de tipo intestinal<sup>25,26,27</sup>. El humo de cigarro, un factor de riesgo importante para carcinomas de cabeza y cuello, solamente tiene una asociación débil con los carcinomas sinonasales<sup>28</sup>.

También existe evidencia importante de que los virus están implicados en este proceso. Los virus considerados de interés en esta área son el virus del papiloma humano (VPH) y virus de Epstein Barr (VEB).

#### **2.4 Virus del Papiloma Humano**

Los tipos de alto riesgo del virus del papiloma humano han sido establecidos firmemente como factores etiológicos importantes del cáncer de cabeza y cuello<sup>29</sup>. Los carcinomas espinocelulares tienen un origen predominante en la orofaringe, en donde tienen una relación en hasta el 80% de los casos<sup>30</sup>. Particularmente comunes son los subtipos papilares y no queratinizantes basaloides originados en las amígdalas palatinas y linguales. El rol del virus en el desarrollo del carcinoma de células escamosas del tracto

15.

nasal y senos paranasales se encuentra menos estudiado que el de los carcinomas cervicales. Numerosos estudios han identificado el virus del papiloma humano en tumores del tracto sinonasal, con resultados muy irregulares, encontrando tasas de detección que van del 0 al 100%<sup>31</sup>. Estas inconsistencias en la detección de VPH reflejan ensayos de detección del virus totalmente disparatados, con procesos neoplásicos y no neoplásicos. La Organización Mundial de la Salud ha reconocido la evidencia de que el VPH es un agente causal de carcinomas en el tracto sinonasal como inadecuado (IARC) <sup>1</sup>.

Los métodos para detectar VPH en las lesiones de cabeza y cuello son técnicamente sencillos. Lo complicado viene al tratar de discernir el rol biológico del virus en la génesis tumoral y su significado clínico en los pacientes. La elección de pruebas para llegar a esta conclusión es compleja y controversial!. Existe una gran variedad de pruebas específicas para VPH, ya sea para identificar ADN, ARN mensajero o sus proteínas. Además, existen marcadores sustitutos que correlacionan con su presencia y significado clínico<sup>32</sup>.

El PCR amplifica una secuencia de ADN por diferentes órdenes de magnitud en ciclos de reacción repetida. Para la detección de VPH el ensayo más comúnmente utilizado amplifica una secuencia de un área altamente conservada del genoma viral en la región L 1, seguida de métodos de detección para tipificar el VPH. Una de las grandes ventajas de la utilización de PCR es que puede realizarse en tejidos embebidos en parafina y fijados en formaldehído, aun y cuando el ADN se encuentre fragmentado. Existen muchas limitantes para la PCR, incluyendo un límite en la sensibilidad cuando se utiliza en tejidos conservados en parafina, la carencia de la detección de donde precisamente se encuentra localizado el virus (ya sea en tejidos tumoral o tejidos sano), y la falta de distinción del estado del virus en las células tumorales.

16.

Los ensayos basados en reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), altamente sensitivos, son capaces de detectar cantidades ínfimas de VPH en lesiones malignas y benignas sinonasales, pero son incapaces de separar la presencia incidental de una infección causante de carcinoma, el cual requiere transcripción nuclear del genoma del VPH, de alteraciones virales en vías celulares del ADN de VPH tipo 16 y 18<sup>33</sup>. Utilizando esta técnica, sin embargo, mucosa aparentemente normal en oídos, nariz y faringe también se encontró con ADN de VPH<sup>1</sup>.

Es aquí donde es posible utilizar marcadores como el **p16**. Mientras que la detección de ADN viral por PCR nos ayuda a establecer si el virus se encuentra presente, el p16 establece que el VPH es biológicamente activo. Como se observó en los 80s con los estudios en carcinomas cervicales, la proteína de supresión tumoral p16 es aberrantemente sobre expresada en los tumores con VPH con actividad de transcripción. La prueba inmunohistoquímica para determinar la presencia de p16 en tumores es aceptada y utilizada ampliamente como marcador pronóstico en pacientes con carcinomas orofaríngeos. Esta es una prueba fácil de realizar e interpretar y se encuentra ampliamente presente en el contexto clínico. Esta proteína es un supresor tumoral en células normales (inhibidor de kinasa 4A ciclina dependiente), el cual regula la fase G1 del ciclo celular. En la mayoría de los tumores con VPH transcripcionalmente activo la proteína E7 se une y degrada a la proteína del retinoblastoma (Rb). Ya que el Rb normalmente actúa como represor de la transcripción de p16, el p16 se ve sobreexpresado de manera masiva<sup>32</sup>.

17.

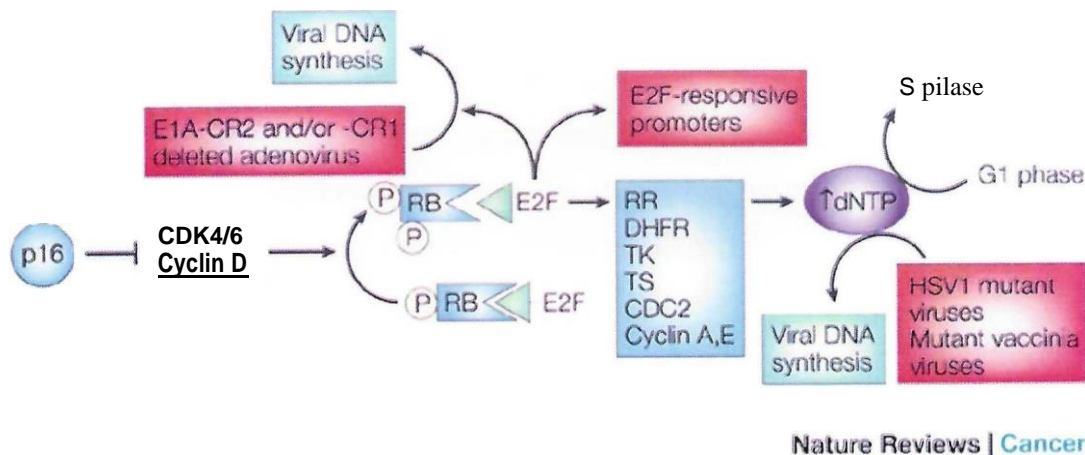


Ilustración 4: Vía del p16

La prueba de inmunohistoquímica para p16 como un marcador de actividad transcripcional es muy dependiente del contexto. Su evaluación debe de ser una positividad nuclear y/o citoplasmática difusa. Para correlacionar con VPH activo, los estudios deben de teñir el núcleo y/o citoplasma y estar presentes en por lo menos 50% de las células tumorales, incrementando esta cifra a 70 o 75% para tener una mejor correlación<sup>32</sup>.

## 2.5 Virus del Epstein Barr

El Virus del Epstein Barr es un herpesvirus. Tiene un ADN de doble cadena de 172 kb que codifica a por lo menos 80 proteínas ..

Casi el 90% de las personas alrededor del mundo pueden encontrarse infectadas con Virus del Epstein Barr, lo cual establece una infección asintomática y persistente en 95% de los individuos expuestos. Infecta de manera mas prominente a los linfocitos B, pero también infecta células epiteliales, específicamente en la orofaringe y nasofaringe. Se cree que inicia la infección al interactuar con las integrinas del huésped y fusionar la envoltura viral con la membrana celular de las células epiteliales basales. Establece un estatus replicativo y librería virus a la saliva mientras la célula huésped se mantenga con vida. El virus también establece diferentes formas

de latencia en las células con perfiles de expresión variados y complejos. Muchas de estas proteínas o genes expresadas, como los ARNs codificados para EBV (EBERs, por sus siglas en inglés) y proteínas latentes de membrana, son importantes para la carcinogénesis subsecuente y son utilizadas para detectar el virus en células tumorales<sup>32</sup>.

Las células infectadas por EBV generalmente muestran uno de tres diferentes patrones de expresión de genes virales asociados a latencia. En la latencia tipo 1, solamente el antígeno nuclear codificado para EBV (EBNA 1) se expresa, además de los ARNs nucleares (EBER 1 y EBER2), expresados en linfoma de Burkitt. El tipo 2 se expresan membranas de proteína (LMP1, LMP2, Y LMP2B), presentes en enfermedad de Hodgkin y carcinoma nasofaríngeo. El tipo 3 se ve en enfermedades linfoproliferativas en individuos inmunocomprometidos.

La proteína de membrana integral LMP-1 se codifica por el gen BNRF1 y contiene 386 amino ácidos con masa molecular de 63kDa. Se considera una proteína oncogénica ya que se implica en por lo menos 4 vías de señalización de factores de transcripción, e induce expresión de marcadores de superficie y moléculas de adhesión celular<sup>34</sup>.

El virus del Epstein Barr (VEB) ha sido conocido como agente etiológico para el desarrollo del cáncer por más tiempo que el VPH, pero tiene una biología complicada. Desde su descubrimiento en los sesentas como el primer candidato a virus asociado a tumor, se ha reconocido como factor etiológico en carcinomas indiferenciados nasofaríngeos y una gran variedad de cánceres hematopoyéticos.

De la misma manera que el VPH, el VEB ha sido asociado a carcinomas nasofaríngeos no queratinizantes e indiferenciados, pero su asociación con

carcinomas sinonasales espinocelulares es menos clara. El hallazgo de VEB por PCR en carcinomas escamosos convencionales es de significado cuestionable, debido a la alta prevalencia de EBV en linfocitos normales".

A diferencia de herpesvirus neutrópicos, el VEB en su fase latente no requiere de un mantenimiento en una célula no proliferante. Este tiene la capacidad de iniciar y mantener la proliferación en las células infectadas. Esta habilidad de afectar la proliferación y supervivencia de sus células infectadas que le otorga su oncogenicidad.

A diferencia de los linfomas, se conoce poco acerca de la génesis de carcinomas infectados con VEB. Se ha encontrado que el 100% de los tumores sinonasales se encuentran infectados con VEB, y que la mayoría de las células tumorales mantiene genomas de plásmidos virales. De esta manera se provee de células con señales proliferantes o de supervivencia, similar a aquellas células con linfoma de Burkitt.

La detección de ADN de VEB por PCR es altamente sensible y específico, y correlaciona con la presencia de un carcinoma, tanto que el éxito del tratamiento y la recurrencia de la enfermedad pueden monitorizarse por esta vía. La inmunohistoquímica para LMP1 es positiva en las células tumorales infectadas con VEB, pero existen casos donde demuestra negatividad o reactividad leve. Los carcinomas nasofaríngeos que son positivos para VEB son consistentemente negativos para p 16<sup>32</sup>.

18.

## **CAPÍTULO 111**

### **3. HIPÓTESIS**

Los papilomas y carcinomas sinonasales se asocian a la presencia del virus de Epstein-Barr y virus del papiloma humano

#### **3.1 Hipótesis nula**

Los papilomas y carcinomas sinonasales NO se asocian a la presencia del virus del Epstein-Barr y virus del papiloma humano

## **CAPÍTULO IV**

### **4. JUSTIFICACIÓN**

Los tumores de senos paranasales representan una causa importante de enfermedad y mortalidad por cáncer\*, con un alto impacto en la sociedad. Por lo tanto es de suma importancia conocer la presencia de EBV y VPH pues dichos resultados podrían ser utilizados posteriormente en el desarrollo de protocolos que establezcan su utilidad en el pronóstico y tratamiento de estos pacientes.

19.

## **CAPÍTULO V**

### **5. OBJETIVO**

#### Objetivo principal

Identificar la presencia de virus del papiloma humano y virus del Epstein Barr en los papilomas sinonasales y carcinomas escamosos sinonasales

#### Objetivos secundarios

Correlacionar la presencia del virus del Epstein Barr y virus del papiloma humano en los papilomas sinonasales y carcinomas escamosos sinonasales

## **CAPÍTULO VI**

### **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización de este trabajo se revisaron los archivos de reportes del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León comprendidos del 1 de enero de 2000 al 31 de diciembre de 2015 en busca de papilomas y carcinomas sinonasales

El universo de nuestra casuística se determinó como "muestra por accidente" en un periodo de tiempo de 15 años.

#### **6.1 Criterios de Inclusión**

- Diagnóstico histológico de papiloma sinonasal o carcinoma escamoso sinonasal
- Productos de biopsia o resección
- Disponibilidad de los bloques de parafina
- Adecuada conservación del tejido

#### **6.2 Criterios de Exclusión**

- Involucro de tumor en tracto sinonasal de manera secundaria
- Ausencia de bloques de parafina
- Inadecuada fijación del tejido
- Laminillas de revisión sin bloques de parafina
- Tejido demasiado escaso para realizar tinciones de inmunohistoquímica o determinación por PCR

### 6.3 Selección del material

Se revisaron todas las laminillas disponibles de cada uno de los casos para seleccionar un área tumoral que fuera representativa de la lesión tumoral. Las secciones de tejido fueron previamente fijadas con formalina al 10% y embebido en parafina. Se realizaron cortes de 3 micras de espesor, montadas en portaobjetos y teñidas con la técnica histológica de rutina de hematoxilina y eosina. Del área marcada se tomó un sacabocado de 5mm del bloque de parafina para la construcción de histoarreglos. Se incluyeron 9 casos por bloque de parafina y un sacabocado de tejido normal como guía. Para cada bloque de parafina se realizaron tinciones de Inmunohistoquímica a base de p16 y EBV

### 6.4 Inmunohistoquímica

Previo a la realización del estudio, las diluciones fueron optimizadas para p 16 a 1: 1000 (Santa Cruz Biotechnology) y EBV (LMP) usado a 1 :200 (Dako North America Inc.) Para cada bloque de tejido embebido en parafina se realizaron secciones de 4 micras, se tiñeron con la técnica Complejo Estreptoavidina-Biotina incluyendo los pasos de desparafinización, incubación del anticuerpo, recuperación antigénica, digestión enzimática y finalmente la visualización usando el método de DAB (Diamino-benzidina) el cual es adicionado y actúa como un sustrato para la peroxidasa; esta reacción crea una coloración café. La peroxidasa endógena en el tejido es bloqueada previamente a la aplicación de los anticuerpos para prevenir una tinción inespecífica.

Anticuerpo	Casa-Clona	Dilución	Patrón de expresión
p16	p16 JC 8 /Santa Cruz Biotecnology	1:1000	Núcleo
EBV	<b>DAKO/CS 1-4</b>	<b>1:200</b>	<b>Núcleo</b>

## **6.5 Detección molecular**

Para detectar la presencia de genomas de VPH y EBV se amplificó su ADN utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) a partir de muestras de tejido embebido en parafina. Se determinó la presencia del virus en muestra de tejido embebido en parafina, las cuales previamente fueron sometidas a un protocolo de extracción de ADN.

### **6.5.1 Extracción de ADN**

Previo a la extracción del ADN, los histoarreglos destinados a la técnica de PCR fueron sometidos a un procedimiento de desparafinización el cual consistió en inmersión en Xilol durante 15 minutos en dos ocasiones; posterior centrifugado a 12000g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 100%; finalmente se agitó manualmente durante 30 minutos para centrifugar y descartar el sobrenadante.

Se cuantificó el ADN obtenido con el espectrofotómetro NanoDrop ND- 8000, obteniendo resultados dentro de los parámetros aceptables de calidad para el DNA.

La extracción del ADN total se realizó mediante el método fenol-cloroformo y la digestión con proteinasa K. Para el proceso de extracción del DNA se agregó 1 ml de etanol al 70% y 1 ml de PBS. Posteriormente se agregó 500ul de amortiguador de lisis y se incubó toda la noche a 52°C en agitación continua. Se agregó 500ul de fenol:cloroformo:isomilalcohol, se agitó y se centrifugó por 5 minutos. El sobrenadante se removió a otro microtubo, se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y se agitó manualmente. Se adicionó un volumen de isopropanol y se almacenó durante la noche. Se centrifugó, y el precipitado se lavó una vez con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó y descartó el sobrenadante. El ADN seco se disolvió en 50ul de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C.

### 6.5.2 Determinación cualitativa de EBV mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Se determinó mediante PCR en tiempo real la presencia del virus Epstein Barr (EBV) en muestras de tejido embebido en parafina, las cuales previamente fueron sometidas a un protocolo de extracción de ADN.

Se detectó la presencia de los genes BLLF1 y LMP2 utilizando ensayos con sondas Taqman, amplificados con el kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)

#### **BLLF1 Assay**

(FAM)AGAAACCTG(ZEN)AGCAAGT AGCCACCC(1BFQ)

BLLF 1-

Probe

GAGGCAGGCAGGAGAA TTTA

BLLF1-Rev

TGAGCAAGAGAGTTCCGATTAC

BLLF1-

Fwd

#### **LMP2 Assay**

( FAM)CTGCTGCT A(ZEN )CTGGCTTTC GTCCTCTGG(1BF Q)

LMP2-

Probe

GCCCCCTGGCGAAGAG

LMP2-Rev

AGCTGTAAGTGTGGTTTCCATGAC

LMP2-Fwd

Previo al análisis de las muestras se realizó una estandarización del método para determinar la cantidad de ADN requerida para obtener amplificado, es decir un resultado positivo.

Dicha estandarización se realizó utilizando 3 muestras control de tejido embebido en parafina, provenientes de pacientes diagnosticados con Linfoma.

Las muestras control fueron sometidas al mismo proceso de extracción de

**ADN** que las muestras problema.

Se trabajó con diferentes diluciones del ADN de las muestras controles y se logró definir un rango de concentración de ADN de 50ng hasta 1 000ng totales para obtener resultados favorables.

23.

Todas la muestras problemas se utilizaron a una concentración aproximada de 400ng totales y las reacciones se prepararon con las siguientes condiciones:

#### Condiciones de reacción

Reactivo	uL/Rx
TaqMan® Universal PCR Master Mix	5
ADN (1 00ng/uL)	2
Assay (4: 1) 10X	1
Agua B. M.	2

Posteriormente fueron amplificadas bajo los siguientes parámetros:

#### Condiciones de amplificación

Programa	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Detección
UNG	50° e	00:02:00	1	None
PRE	95° e	00: 10:00	1	None
AMP	95° e 55° e 60° e	00:00: 1 0 00:00:05 00:01 :00	60	Single
Cooling	50° e	00:00:10	1	None

#### Interpretación de Resultados

El análisis se datos se llevo a cabo utilizando el método de la segunda derivada con el que se evaluó la intensidad de fluorescencia basal vs fluorescencia después de cada ciclo de amplificación.

Un cambio en la intensidad de fluorescencia nos indica que hay presencia de material genético del patógeno en cuestión.

#### 6.6 Evaluación de los resultados

24.

Cada laminilla de Inmunohistoquímica se evaluó para la presencia o ausencia de expresión para p 16 y EBV utilizando microscopía de luz.

Se definió como positividad la presencia de expresión nuclear en una proporción mayor al 70% de las células tumorales de cada componente. La intensidad fue valorada como presente o ausente.

Los productos de la RT-PCR múltiple fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio ( $0.5 \mu\text{g/mL}$ ) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. El análisis de datos se llevó a cabo mediante un método visual en el que se busca la presencia de una banda de amplificación de tamaño determinado para emitir un resultado positivo.

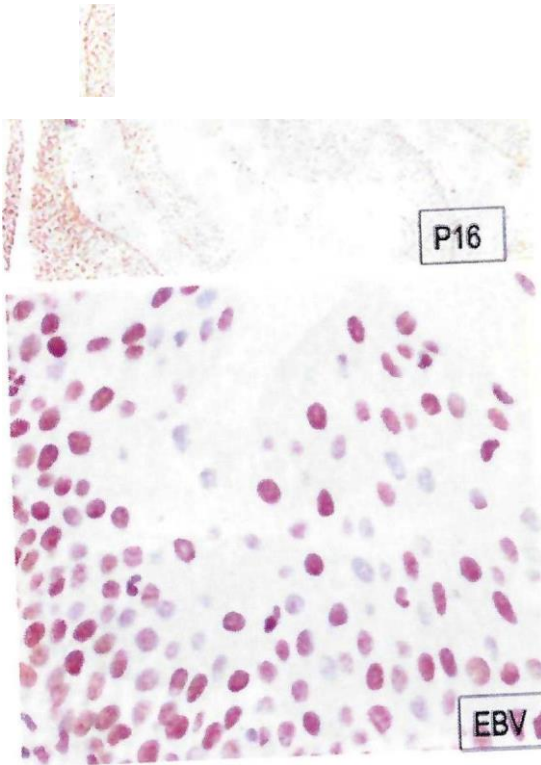
El producto de PCR se somete a un proceso de electroforesis mediante el cual las moléculas de ADN se separan por cargas y peso molecular. Dichos productos de ADN se marcan previamente con un agente fluorescente que se intercala entre sus hebras y permite su visualización al exponerse a radiación UV.

En el caso de HPV analizado con el juego de primers MY se espera obtener una banda 450pb aproximadamente y se espera obtener una banda de aproximadamente 150pb cuando se utiliza el juego de primers GP.

Los productos de PCR en tiempo real fueron analizados por medio de gráficos de amplificación. Se considera positiva al cruzar el valor de umbral que señala la zona de aumento exponencial. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el método de la segunda derivada, con el que se evaluó la intensidad de fluorescencia basal vs fluorescencia después de cada ciclo de amplificación.

Un cambio en la intensidad de fluorescencia nos indica que hay presencia de material genético del patógeno en cuestión.





P16

EBV

Ilustración 7 Positividad y negatividad para p16 J EBV en papiloma sinonasal invertido

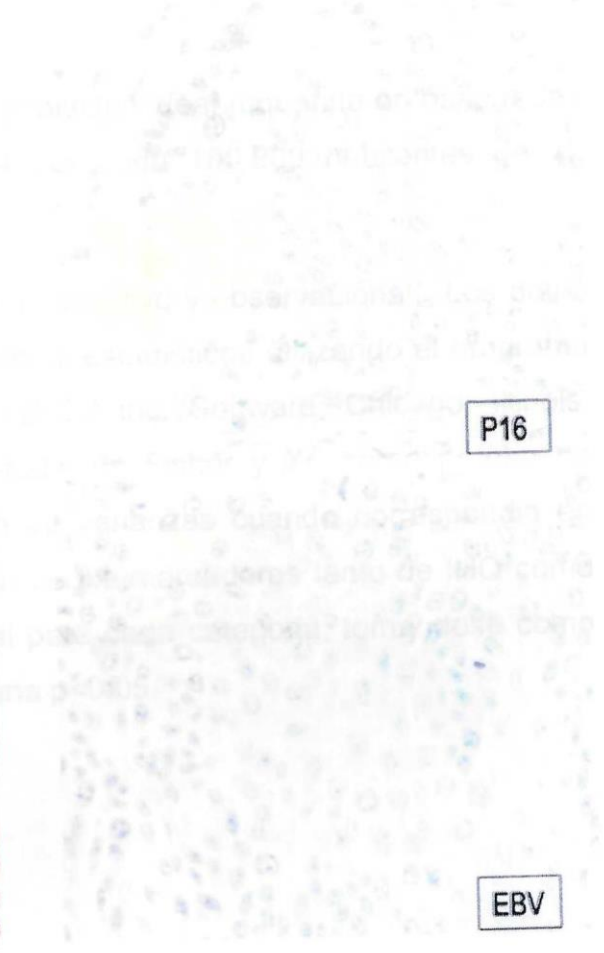
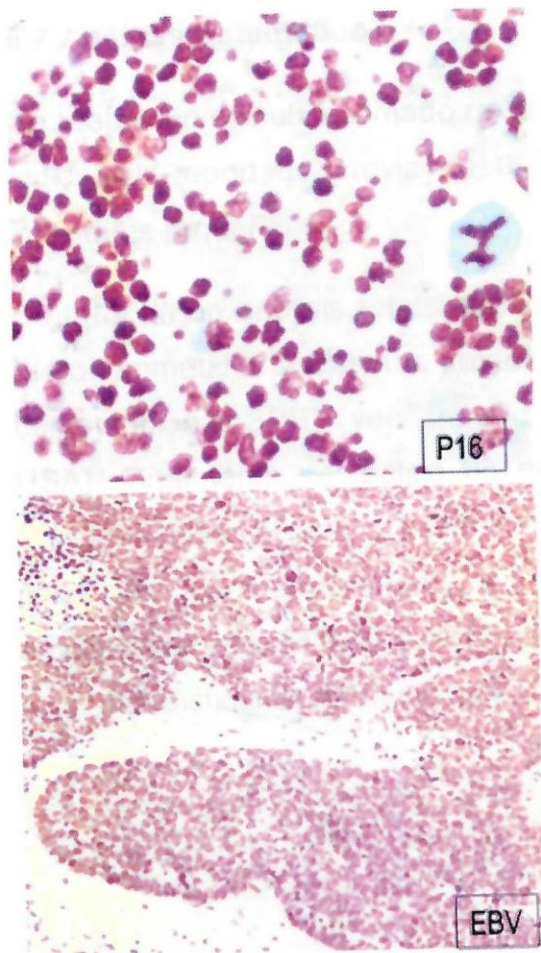


Ilustración 8 Positividad y negatividad para p16 y EBV en carcinomas sinonasales

## **6. 7 Análisis Estadístico**

Se realizó un cálculo estimado de la población ideal requerida en base a una incidencia reportada previa de 0.74 por cada 100,000 habitantes de 12 individuos requeridos.

Se trata de un análisis retrospectivo, descriptivo y observacional. Los datos fueron sometidos a distintos tratamientos estadísticos utilizando el programa computacional SPSS versión 17 (SPSS Inc. Software, Chicago, Illinois, USA). Finalmente se realizó un estudio de Fisher y  $X^2$  como prueba de independencia y para la estimación de varianzas cuando correspondía en cada caso, comparando la expresión de los marcadores tanto de IHQ como amplificación por PCR del ADN viral para cada categoría, tomándose como valor estadísticamente significativo una  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO VII

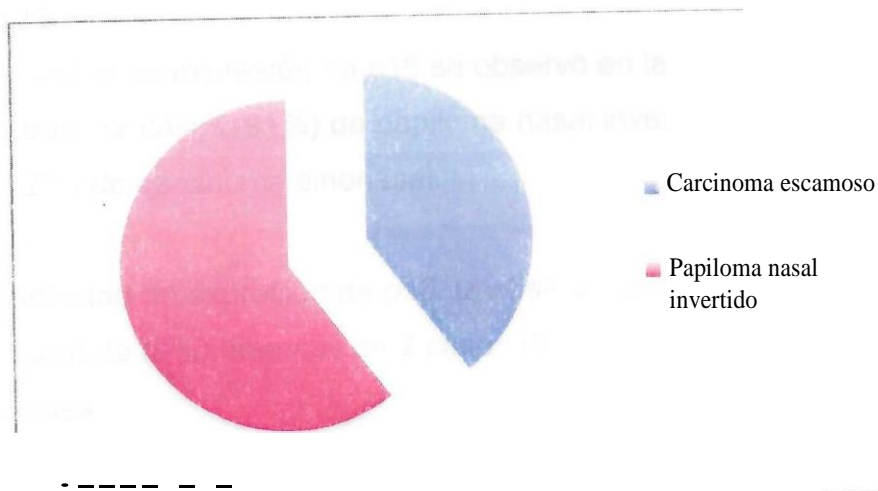
### 7. RESULTADOS

#### 7.1 Datos generales

Se recolectó una población total de 70 individuos con papilomas nasales invertidos y carcinomas escamosos sinonasales, de los cuales 58 casos cumplieron con todos los criterios de inclusión.

Los casos se dividieron en dos grupos

- 35 papilomas invertidos
- 23 carcinomas escamosos



Gráfica de la distribución de tumores sinonasales en carcinoma escamoso y papiloma nasal invertido

Se realizó tinción de inmunohistoquímica en 57 casos, exceptuando un caso por falta de material.

30.

Los hallazgos se resumen en la tabla 1

**Tabla 1**

	<b>Papilomas</b>	<b>Carcinoma</b>	<b>p</b>
p16	32 (91%)	21 (91%)	p=0.361379983
EBV (IHQ)	18 (51%)	13 (49%)	p=0.77006
VPH	8 (23%)	8 (35%)	p=0.487836
EBV (PCR)	7 (20%)	6 (26%)	p=0.824348

## **7.2 Expresión de los marcadores de inmunohistoquímica**

### **7.2.1 p16**

La positividad de expresión de p16 se observó en la mayoría de los casos estudiados: 32 casos (91 %) de papiloma nasal invertido, además de 21 casos (2%) de carcinoma sinonasal.

La negatividad de expresión de p16 se observó en 3 casos de papiloma nasal invertido (9%), además de 2 casos (9%) de los carcinomas sinonasales.

Entre los papilomas nasales invertidos y los carcinomas sinonasales en cuanto a proporción de expresión de p16 por inmunohistoquímica, no hay una diferencia significativa estadísticamente ( $p=0.361379983$ )

### **7.2.2 EBV**

La positividad de expresión de EBV se observó en 18 casos (51 %) de los papilomas nasales invertidos, además de 13 casos (59%) de los carcinomas.

La negatividad de la expresión de EBV se observó en los 17 casos restantes (49%), mientras que se observó negativo en 9 casos (41 %)

Entre los papilomas nasales invertidos y los carcinomas sinonasales en cuanto a proporción de expresión de EBV por inmunohistoquímica, no hay una diferencia significativa estadísticamente ( $p=0.77006$ )

## **7.3 Presencia de virus detectada molecularmente por PCR**

### **7.3.1 VPH**

La presencia del virus del VPH se observó en 8 casos (23%) de los papilomas nasales invertidos, además de 8 casos (35%) de los carcinomas.

No fue posible detectar la presencia del virus del VPH en 27 casos (77%) de los papilomas nasales invertidos, además de 15 casos (65%) de los carcinomas.

Entre los papilomas nasales invertidos y los carcinomas sinonasales en cuanto a proporción de detección por PCR puntual, no hay una diferencia significativa estadísticamente ( $p=0.487836$ )

### **7.3.2 EBV**

La presencia del virus del EBV se observó en 7 casos (20%) de los papilomas nasales invertidos, además de 6 casos (26%) de los carcinomas.

No se detectó la presencia del virus del EBV en 28 casos (80%) de los papilomas nasales invertidos, además de 17 casos (74%) de los carcinomas.

Entre los papilomas nasales invertidos y los carcinomas sinonasales en cuanto a proporción de detección por PCR puntual, no hay una diferencia significativa estadísticamente ( $p=0.824348$ )

## CAPÍTULO VIII

### 8. DISCUSIÓN

El agente etiológico relevante para el carcinoma de tracto sinonasal no se ha reconocido todavía. Cualquier esfuerzo por entender, prevenir y tratar estos carcinomas se ve detenido. De manera diferente a otras áreas de cabeza y cuello, como la cavidad oral y la laringe, donde la tumorigenesis es atribuida de manera importante a los efectos carcinogénicos de el huso del tabaco, fumar no se asocia de manera fuerte a carcinomas con un origen en el tracto sinonasal. La exposición al polvo de madera ha sido establecido como agente causante, pero este vínculo esta restringido a un subgrupo de adenocarcinomas sinonasales que no es considerado dentro de la vasta mayoría de carcinomas que se encuentran en el tracto sinonasal. La detección frecuente de VPH ha evocado cierta asociación débil, pero no se ha probado un rol activo en la carcinogénesis.

La experiencia adquirida por medio de carcinomas escamosos de la orofaringe ha ayudado en el entendimiento hacia la tumorigenesis y métodos de detección de VPH. La integración de AON de VPH, expresión de transcripción de ARN mensajero y la disrupción de vías regulatorias críticas (p53) son pasos secuenciales y acoplados que proveen múltiples opciones para la detección del virus. Por ejemplo, la inactivación del virus del retinoblastoma por la oncoproteína E7 induce sobreexpresión del p16 de tal manera que la detección de p16 por medio de inmunohistoquímica sirve como marcador confiable para la detección de VPH<sup>35</sup>.

En la orofaringe, la presencia dual de ADN de VPH como se visualiza en PCR, además de niveles altos de expresión de proteína p16 detectada por

inmunohistoquímica se toma como evidencia para la actividad biológica del VPH. En este sitio anatómico, el carcinoma escamoso relacionado al VPH ha emergido como un tipo único de cáncer de cabeza y cuello con una epidemiología, demográfica, histopatología y perfil clínico único. No está del todo claro si la positividad para VPH confiere un set distintivo de características epidemiológicas y clínicas para los carcinomas del tracto sinusal. La detección de VPH en estos tumores sugiere que la infección es un factor de riesgo importante y no ha sido elucidado.

En la literatura mundial se ha encontrado una prevalencia de alrededor del 30% de VPH en los carcinomas sinusales. Esto puede tener implicaciones clínicas, con mejores tasas de progresión libre de enfermedad y de supervivencia al compararse con tumores VPH negativos.

En la última década, existen estudios importantes dirigidos hacia la detección de VPH de alto riesgo transcricionalmente activo en carcinomas sinusales. Estos estudios utilizan una combinación de p16 en inmunohistoquímica y detección de ADN de VPH por FISH o PCR. A través de este estudio, McMannus encontró que 31 de 151 (20.5%) de los casos de carcinoma fueron positivos para ambos casos. Esto significa que la región sinusal es un punto con alta actividad para los carcinomas con VPH de alto riesgo, después de la orofaringe. El pronóstico para estos tumores fue

más favorable que para aquellos negativos para VPH.

La proporción de positividad para VPH en el carcinoma sinusal correlaciona con lo reportado en la literatura, donde McMannus encontró un 20.5% de positividad de VPH por PCR. similar a nuestro 23% por PCR. Syrjanen encontró una proporción del 27% por cualquier método, y Bishop 21 % en 161 casos por PCR y 37% mostraron positividad para p16, muy diferente a el 91 % demostrado en el presente estudio.

La relación con los papilomas es mas complicada, pero aunque el VPH de alto riesgo se ve involucrado con la patogenia de estas neoplasias. Pero los carcinomas que se desarrollan de estos papilomas casi siempre tienen morfología queratinizante, y ninguna tiene VPH. El virus puede llevar el desarrollo de carcinoma escamosos desde estas lesiones precursoras, pero no lleva el crecimiento de tumores establecidos. Como tal, el carcinoma sinonasal no queratinizantes con VPH tienen un origen espontaneo, sin un papiloma precursor. Estos tumores p16 positivos se consideran de mejor pronostico y deben de tener una mejor respuesta a tratamiento, particularmente a la radiación y quimioterapia.

En el presente estudio se encontró genes para VPH en el 23% de los papilomas, difiriendo de lo reportado por Weber, quien reporta un 76%, difiriendo de esta estadística. Sham, en un estudio realizado en Hong Kong, encontró solamente el 4.1 % de detección de VPH en papilomas, demostrando cifras completamente opuestas. Por otro lado, Furuta reporta 19%, Hasegawa 46%, Bradwein 71 %, Weiner 6.8%, y Beck en dos ocasiones reporto 63%.

El 91 % de los papilomas sinonasales de nuestro estudio fueron positivos para p16. Esto concuerda con la literatura mundial, coincidiendo con los estudios realizados por Yamashita (82.5%), Lin (64%), y Altavilla (82%)

Es difícil reconciliar estos datos tan conflictivos, además de dar mucha credibilidad a diferencias geográficas o poblacionales. En su revisión de métodos para la detección de VPH en tejidos concluye que lo único que resta es que pruebas mas sofisticadas puedan ser predictivas.

La relación de los tumores sinonasales con el EBV es limitada, encontrándose mucho mayor relación con los carcinomas nasofaríngeos. Sin embargo, en nuestro estudio se reporta una positividad para el 51 % de los

31.

casos por inmunohistoquímica y 20% por PCR para los papilomas sinonasales. Esto difiere a lo reportado por Sham, quien no presenta ningún caso positivo de 73 papilomas nasales invertidos Gaffey reporta que el EBV no se encuentra presente en los papilomas sinonasales, habiendo realizado su búsqueda por medio de PCR y procedimientos de hibridación in situ para EBER 1. En los carcinomas sinonasales Doescher encontró que el 45% de los carcinomas sinonasales presentaron positividad de EBV por inmunohistoquímica y 31 % mostraron presencia del virus por PCR. Esto es similar a nuestros datos de 49% y 26% respectivamente

## CAPÍTULO IX

### 9. CONCLUSIÓN

La mayor parte de los papilomas nasales invertidos fueron positivos para p16 (91 %), además de presentar la presencia del virus del papilloma humano en el 23%. El 51 % de los papilomas presnetan positividad para virus del Epstein Barr por inmunohistoquímica, además de detectarse el virus en el 20% de los casos.

Los carcinomas sinonasales presentan en un 91 % positividad para p16, y el virus del papiloma humano en el 35% de los casos. El 49% de los casos es positivo para el virus del Epstein Barr, y en el 26% de los casos es detectable por PCR.

De acuerdo a los resultados encontrados en el analisis histologico, inmunohistoquimico y de biologia molecular realizado en los casos de papilomas nasales invertidos y carcinomas sinonasales, llegamos a la conclusion de que en base a la hipotesis no se presenta una diferencia de proporción estadísticamente significativa de la expresion del EBV y VPH en papilomas nasales invertidos y carcinomas sinonasales.

Consideramos que los hallazgos encontrados en este studio son importantes y esperamos que sean un paso que permita el desarrollo de bnuevos estudios que traten de esclarecer el significado prinostico y posiblemente terapeutoco que la presencia y actividad del virus del papilloma humano y el virus del epresin barr puedan tener, pues el hecho de contar con terapeuticas dirigidas a estas entidades hacen de vital interes esclarecer el rol que podira jugar la expresion mostrrada en este trabajo.

## CAPÍTULO X

### 10. BIBLIOGRAFÍA

32. Gnepp, Douglas: Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck, segunda edición, 2009, Saunders ,Elsevier
33. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology - 2 Volume Set: Expert Consult: Online and Print, decimal edición, 2011, Mosby
34. D'Angelo AJ, Marlowe A, Marlowe FI, and McFarland M: Inverted papilloma of the nose and paranasal sinuses in children. Ear Nose Throat J 1992; 71: pp. 264-266
35. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, 4 edición, Churchill-Livingstone, 2005
36. Hyams VJ: Papillomas of the nasal cavity and paranasal sinuses. A clinicopathologic study of 315 cases. Ann Otol Rhinol Laryngol 1971; 80: pp. 192-206
37. Michaels L: Benign mucosal tumors of the nose and paranasal sinuses. Semin Diagn Pathol 1996; 13: pp. 113-117
38. Oberman HA: Papillomas of the nose and paranasal sinuses. Am J Clin Pathol 1964; 42: pp. 245-258
39. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, sexta edición, Wolters Kluwer, 2015
40. Barnes L, and Bedetti C: Oncocytic schneiderian papilloma. A reappraisal of cylindrical cell papilloma of the sinonasal tract. Hum Pathol 1984; 15: pp. 344-351
41. Krisch I, Neuhold N, and Krisch K: Demonstration of secretory component, IgA, and IgM by the peroxidase-antiperoxidase technique in inverted papillomas of the nasal cavities. Hum Pathol 1984; 15: pp. 915-920
42. Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K, and Maier H: Coexpression of cytokeratins typical for columnar and squamous differentiation in

sinonasal inverted papillomas. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: pp. 747- 754

12. Outzen KE, Grontved A, Jorgensen K, and Clausen PP: inverted papilloma of the nose and paranasal sinuses. A study of 67 patients. *Clin Otolaryngoi* 1991; 16: pp. 309-312
13. Maitra A, Baskin LB, and Lee EL: Malignancies arising in oncocytic schneiderian papillomas: a report of two cases and review of a literature. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: pp. 1365-1367
14. Nieisen PL, Buchwaid C, Nielsen LH, and Tos M: Inverted papilloma of the nasal cavity. Pathological aspects in a follow-up study. *Laryngoscope* 1991; 101: pp 1094-1101
15. Lasser A, Rothfeld RP, and Shapiro RS: Epithelial papilloma and squamous cell carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. A clinicopathological study. *Cancer* 1976; 38: pp. 2503-2510
16. Benninger MS, Roberts JK, Sebek BA, Levine HL, Tucker HM, and Lavertu P: Inverted papillomas and associated squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 103: pp. 457-461
15. Pelausa EO, and Fortier MA: Schneiderian papilloma of the nose and paranasal sinuses. The University of Ottawa experience. *J Otolaryngol* 1992; 21: pp. 9-15
18. Fechner RE, and Aiford DO: Inverted papilloma and squamous carcinoma. An unusual case. *Arch Otolaryngoi* 1968; 88: pp. 507-512
19. Myers EN, Fernau JL, Johnson JT, Tabet JC, and Barnes EL: Management of inverted papilloma. *Laryngoscope* 1990; 100: pp. 481-492
20. Lawson W1, Ho BT, Shaari CM, Biller HF., Inverted papilloma: a report of 112 cases. *Laryngoscope*. 1995 Mar;105(3 Pt 1)-282-8.
21. Ogura H1, Fukushima K, Watanabe S. A high prevalence of human papillomavirus DNA in recurrent nasal papillomas, *J Med Microbiol*. 1996 Sep;45(3): 162-6.

22. Rousch, Epidemiology of cancer of the nose and paranasal sinuses. Current concepts Head Neck Surgery 1979, 2; pp3-11
23. Furuta Y, Shinohara T, Sano K, Nagashima K, Inoue K, Tanaka K, and Inuyama Y: Molecular pathologic study of human papillomavirus infection in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of the nasal cavities and paranasal sinuses. Laryngoscope 1991; 101: pp. 79-85
24. Robin PE, and Shortridge RT J: Lateralisation of tumours of the nasal cavity and paranasal sinuses and its relationship to aetiology. Lancet 1979; 1: pp. 695-696
25. Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, et al. Wood dust and sinonasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies. Am J Ind Med. 1995;28:151-166.
26. d'Errico A, Pasian S, Baratti A, et al. A case-control study on occupational risk factors for sinonasal cancer. Occup Environ Med. 2009;66:448-455.
27. Luce D, Leclerc A, Begin D, et al. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. Cancer Causes Control. 2002;13:147-157.
28. Hayes RB, Kardaun JW, de Bruyn A. Tobacco use and sinonasal cancer: a case-control study. Br J Cancer. 1987;56:843-846.
29. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 2000;92:709-720.
30. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. Cancer. 2010; 116:2166-2173.
31. Bishop JA1, Guo TW, Smith DF, Wang H, Ogawa T, Pai SI, Westra WH. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. Am J Surg Pathol. 2013 Feb;37(2):185-92.

44.

32. McMannus, Linda. Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. Elsevier, 2014
33. Furuta Y, Takasu T, Asai T, et al. Detection of human papillomavirus DNA in carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses by polymerase chain reaction. *Cancer*. 1992;69:353-357.
34. Cruchley AT, Williams DM, Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus: biology and disease [review]. *Oral Diseases* 1997;3 Suppl 1: S156-63.
35. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck*. 2012;34:459-461.
36. Christensen WN, and Smith RRL: Schneiderian papillomas. A clinicopathologic study of 67 cases. *Hum Pathol* 1986; 17: pp. 393-400
37. Ridolfi RL, Liberman PH, Erlandson RA, and Moore OS: Schneiderian papillomas. A clinicopathologic study of 30 cases. *Am J Surg Pathol* 1977; 1: pp. 43-53
38. Snyder RN, and Perzin KH: Papillomatosis of nasal cavity and paranasal sinuses (inverted papilloma, squamous papilloma). A clinicopathologic study. *Cancer* 1972; 30: pp. 668-690
39. Vrabec DP: The inverted schneiderian papilloma. A clinical and pathological study. *Laryngoscope* 1975; 85: pp. 186-220
39. Gaffey MJ, Frierson HF, Weiss LM, Barber CM, Saber GB, and Stoler MH: Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in sinonasal schneiderian papillomas. An in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: pp. 475-482
- 40.1. Judd R, Zaki SR, Coffield LM, and Evatt BL: Sinonasal papillomas and human papillomavirus. Human papillomavirus 11 detected in fungiform schneiderian papillomas by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 1991; 22: pp. 550-556
- 42.. McLactlin CM, Kandel RA, Colgan I J, Swanson OB, Witterick J and Ngan BY: Prevalence of human papillomavirus in sinonasal

45.

papillomas. A study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Mod Pathol* 1992; 5: pp. 406-409

43. Sarkar FH, Visscher DW, Kintanar EB, Zarbo RJ, and Crissman JO: Sinonasal schneiderian papillomas. Human papillomavirus typing by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1992; 5: pp. 329-332
44. Shen J, Tate JE, Crum CP, and Goodman ML: Prevalence of human papillomaviruses (HPV) in benign and malignant tumors of the upper respiratory tract. *Mod Pathol* 1996; 9: pp. 15-20
45. Fu YS, Hoover L, Franklin M, Cheng L, and Stoler MH: Human papillomavirus identified by nucleic acid hybridization in concomitant nasal and genital papillomas. *Laryngoscope* 1992; 102: pp. 1014-101
46. Macdonald MR, Le KT, Freeman J, Hui MF, Cheung RK, and Dosch HM: A majority of inverted sinonasal papillomas carries Epstein-Barr virus genomes. *Cancer* 1995; 75: pp. 2307-2312
47. El-Mofty SK, and Lu DW: Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: pp. 1367-1372
48. Cerilli LA, Holst VA, Brandwein MS, Stoler MH, and Milis SE: Sinonasal undifferentiated carcinoma: immunohistochemical profile and lack of EBV association. *Am J Surg* 2001; 25: pp. 156-163
49. Paulina AF, Singh B, Carew J, Shah JP, and Huvos AG: Epstein-Barr virus in squamous carcinoma of the anterior nasal cavity. *Ann Diagn Pathol* 2000; 4: pp. 7-10
50. Syrjanen S, Happonen RP, Virolainen E, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) structural antigens and DNA types in inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol.* 1987; 104:334-341.
- 5-1. Shen J, Tate JE, Crum CP, et al. Prevalence of human papillomaviruses (HPV) in benign and malignant tumors of the upper respiratory tract. *Mod Pathol.* 1996;9: 15-20

46.

52. Saegusa M, Nitta H, Hashimura M, et al. Down-regulation of p27Kip1 expression is correlated with increased cell proliferation but not expression of p21 waf1 and p53, and human papillomavirus infection in benign and malignant tumours of sinonasal regions. *Histopathology*. 1999;35:55-64.
53. Alos L, Moyana S, Nadal A, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer*. 2009; 115:2701-2709.
54. Buchwald C, Lindeberg H, Pedersen BL, et al. Human papilloma virus and p53 expression in carcinomas associated with sinonasal papillomas: a Danish Epidemiological study 1980-1998. *Laryngoscope*. 2001;111:1104-1110.
55. Cheung FM, Lau TW, Cheung LK, et al. Schneiderian papillomas and carcinomas: a retrospective study with special reference to p53 and p16 tumor suppressor gene expression and association with HPV. *Ear Nose Throat J*. 2010;89:E5-E12.
56. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of high-risk human papilloma- virus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1367-1372
57. Jo VY, Mil Is SE, Stoler MH, et al. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009;33: 1720-1724.
58. Kashima HK, Kessis T, Hruban RH, et al. Human papillomavirus in sinonasal papillomas and squamous cell carcinoma. *Laryngo- scope*. '1992; 102:973-976.
59. Kleini PJ, Joensuu H, Siivonen L, et al. Association of DNA aneuploidy with human papillomavirus-induced malignant trans- formation of sinonasal transitional papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989; 100: 563-567.