

Detección del receptor de factor de crecimiento epidérmico en lesiones orales premalignas por relaxometría

Detection of the epidermal growth factor receptor by relaxometry of oral premalignant lesions

MSc. Yamirka Alonso Geli^I, Lic. Enrique Reynaldo De la Cruz^{II}, MSc. Carlos M. Dutok Sánchez^{III}, Dr. C. Eloy D. Álvarez Guerra^I

^I Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba.

^{II} Departamento de Jardín Botánico. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT). CITMA-Holguín, Cuba.

^{III} Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: detectar la sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico en células epiteliales de lesiones premalignas de la mucosa bucal, marcadas magnéticamente por relaxometría.

Métodos: las células exfoliadas de mucosa oral de individuos sanos y enfermos se marcaron con el sistema: IgG anti-EGF-R biotinilada/IgG anti-biotina conjugada con partículas superparamagnéticas y se midieron los tiempos de relajación T_1 y T_2 .

Resultados: disminuyeron los tiempos de relajación (T_1 y T_2) de las células marcadas respecto a las no marcadas, en todas las muestras analizadas. Al comparar los valores de T_1 y T_2 de las células marcadas de la lesión con los valores de las células sanas, se encontró una disminución estadísticamente significativas del tiempo de relajación. Al comparar los tiempos de relajación de células marcadas sanas con los de las células de las diferentes lesiones encontramos diferencias estadísticamente significativas para los casos de células de leucoplasias y liquen plano tanto en T_1 como T_2 ; no así con células de queratosis.

Conclusiones: los resultados muestran que es posible detectar por relaxometría células que expresen el receptor de factor de crecimiento epidérmico, utilizando el sistema conjugado empleado y que el EGF-R se sobreexpresa en células de lesiones como leucoplasia y liquen plano.

Palabras clave: receptor de factor de crecimiento epidérmico, lesiones premalignas, relajación magnética protónica, tiempo de relajación.

ABSTRACT

Objective: Detect the overexpression of the epidermal growth factor receptor in epithelial cells of premalignant lesions of the oral mucosa magnetically marked by relaxometry.

Methods: Exfoliated oral mucosa cells from healthy and sick individuals were marked with the system biotinylated anti-EGF-R IgG / anti-biotin IgG conjugated with supermagnetic particles and measurements were taken of relaxation times T1 and T2.

Results: In all the samples analyzed there was a decrease in the relaxation times (T1 and T2) of marked cells with respect to unmarked cells. Comparison of the T1 and T2 values of marked cells from the lesion with the values of healthy cells revealed a statistically significant decrease in relaxation time. Comparison of the relaxation times of healthy marked cells with those of cells from the various lesions revealed statistically significant differences in both T1 and T2 in cells from lichen planus and leukoplakias, but not in cells from keratoses.

Conclusions: Results show that relaxometry may be used to detect cells expressing the epidermal growth factor receptor, using the conjugated system described herein, and that EGF-R is overexpressed in cells from lesions such as leukoplakia and lichen planus.

Key words: epidermal growth factor receptor, premalignant lesions, proton magnetic relaxation, relaxation time.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de la cavidad oral representa uno de los tipos de tumores malignos más frecuentes en el mundo,¹ y la incidencia de nuevos casos indica un aumento continuo del mismo.² Más del 90% de los cánceres orales se caracteriza histológicamente como carcinomas de células escamosas.³ A pesar de todos los esfuerzos que se realizan, la tasa de mortalidad por cáncer bucal se ha mantenido elevada (~ 50 %) durante las últimas décadas.^{4,5}

La conversión de células del epitelio normal a células cancerígenas se conduce por múltiples procesos⁶ que se asocian a la acumulación de diversas anomalías que afectan los genes de reparación de ADN, oncogenes y genes de supresión tumoral que a su vez determinan la acción de una serie de factores de crecimiento y sus receptores, entre ellos el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R).⁷ El estudio de los receptores de factor de crecimiento ha ocupado un lugar

importante en la oncología experimental en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de las neoplasias malignas.^{8,9}

Muchos carcinomas orales se desarrollan a partir de las lesiones premalignas de la cavidad oral¹⁰ como leucoplasia, eritroplasia, lesión del paladar, liquen plano, fibrosis submucosa oral, lupus eritematoso discoideo y enfermedades hereditarias como la disqueratosis congénita y la epidermólisis bullosa.¹¹

A pesar de la fácil accesibilidad de la cavidad oral para un examen, el cáncer oral se detecta generalmente en etapas avanzadas de desarrollo,¹² desafortunadamente no existe un método para detectar precozmente y de manera adecuada el cáncer oral y las lesiones precancerosas; en la práctica actual, se identifican mediante inspección visual y palpación de las áreas clínicamente anormales,⁶ y se diagnostican a través de biopsia quirúrgica y examen histológico del tejido extirpado. Sin embargo, la identificación visual de las lesiones tempranas puede ser difícil incluso para los médicos con experiencia^{1,9} ya que algunas lesiones premalignas son indistinguibles de lesiones benignas y debido a la naturaleza invasiva de la biopsia quirúrgica, el desarrollo de nuevas técnicas de detección precoz está enfocado hacia la evaluación no invasiva del potencial de malignidad de la lesión, por lo que es importante contar con un método objetivo y no invasivo para su identificación.⁹

En la detección de células precancerosas y cancerosas en etapas tempranas de su desarrollo se emplean numerosos marcadores moleculares y se trabaja en la búsqueda de estrategias de diagnóstico y tratamiento que incluyan aplicaciones y análisis moleculares en los que participen estas proteínas o sus alteraciones. La detección temprana del cáncer mejora notablemente la efectividad de los tratamientos empleados y la tasa de supervivencia de los pacientes.¹

El receptor de factor de crecimiento epidérmico está altamente sobreexpresado en neoplasias orales por lo que es una molécula blanco ideal para el desarrollo de técnicas no invasivas de detección precoz del cáncer.¹³

En este trabajo nos proponemos determinar la expresión del receptor de EGF en células epiteliales sanas y pre-malignas de diferentes lesiones de la mucosa bucal por relaxometría a bajos campos, empleando un sistema de anticuerpos conjugados con partículas magnéticas. Esta técnica tiene la ventaja de ser no invasiva y permitirá la detección precoz de células premalignas y malignas, en pacientes con lesiones orales.

MÉTODOS

Muestras

Se obtuvieron las células por citología exfoliativa de la mucosa bucal de individuos sanos y pacientes con lesiones en el epitelio de la cavidad oral, previo consentimiento informado de los individuos incluidos en el estudio.

Los pacientes se seleccionaron en la consulta del Programa de Detección Precoz del Cáncer Bucal de la Clínica Estomatológica Provincial Docente "Mártires del Moncada" de Santiago de Cuba y se clasificaron según el tipo de lesión que presentaron en la inspección clínica.

Purificación del anticuerpo monoclonal anti EGF-R a partir de líquido ascítico murino

Se purificaron los anticuerpos monoclonales anti EGF-R a partir de líquido Ascítico Murino de ratones BAL/C por Cromatografía de Afinidad Proteína A Sepharosa siguiendo el protocolo descrito por Pico *et al.*¹⁴

Protocolo de Biotinilación del anticuerpo monoclonal anti EGF-R

Se sigue el procedimiento de Biotinilación de proteínas recomendado por los suministradores del producto (PIERCE Biotechnology Inc. 9/2004.)¹⁵

Marcaje celular

Se depositan 80 μ L de muestra (suspensión de células epiteliales de la mucosa oral lavadas a una concentración de 1×10^6 células) en un vial eppendoff, se adicionan 40 μ L de IgG murina anti EGF-R biotinilada, se incuba durante 15 minutos a 10°C, se lavar dos veces con PBS pH 7.4, se centrifuga a 1500 r.p.m durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 80 μ L de PBS pH 7.4. Se le adiciona 20 μ L de IgG anti-biotina conjugado con nanopartículas magnéticas¹⁶ se incuba durante 15 min. a 10°C, se lava una vez con PBS y el pellet se resuspende en 350 μ L de PBS. Se transfiere la muestra a un ampulla.

El blanco se procesa igual que las muestras exceptuando el paso 1, en el que se adiciona 40 μ L de PBS pH 7.4 en sustitución de la IgG murina anti EGF-R biotinilada.

Medición de T_1 y T_2 de las células sanas y premalignas

Se determinan los tiempos de relajación T_1 y T_2 a 4 MHz en el Relaxómetro Universal Giromag® 02 en muestras de suspensiones de células exfoliadas de la mucosa bucal marcadas magnéticamente con un sistema de anticuerpos unidos a partículas magnéticas que incluye un anticuerpo primario IgG monoclonal murina anti EGF-R biotinilado y un anticuerpo secundario IgG monoclonal murino anti biotina conjugado con partículas super paramagnéticas.

Las mediciones de T_1 y T_2 se realizaron a 25°C utilizándose en la determinación de T_2 la serie de impulso 90°-t-180° para T_1 se utilizó la serie de impulso de 180°-t-90°.

Se trabajo con 10 muestras y se realizaron 2 réplicas por muestras.

Análisis estadístico de los datos

Comparaciones múltiples de medias por la prueba Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica). Para probar la igualdad entre las medias de los grupos no pareados se utilizó la Prueba t de Student con la corrección de Hurltley.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete SPSS 13.0.1 para Windows.

RESULTADOS

Medición de los tiempos de relajación en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal de individuos sanos

Se compararon los tiempos de relajación T_1 y T_2 de células marcadas (muestras) respecto a las células no marcadas (blancos) de individuos supuestamente sanos y en todos los casos se observa una disminución de los tiempos de relajación en un 28 %, tanto para T_1 como para T_2 ; la comparación de las medias, arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) entre ambas muestras (para un

En la figura 1 se representan gráficamente los resultados, los datos mostrados corresponden a los valores medios de 10 muestras de individuos sanos.

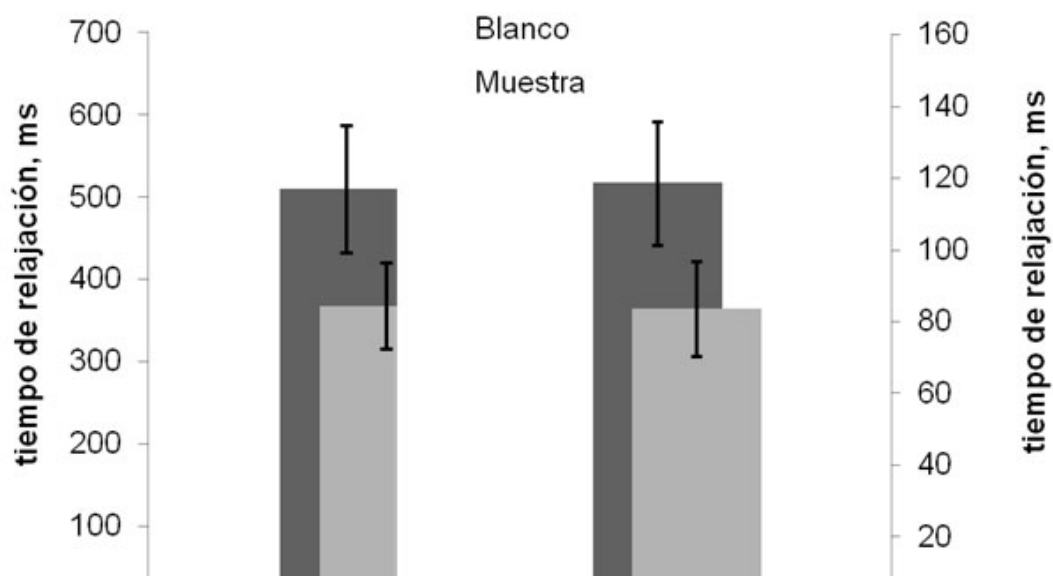


Fig. 1. Representación gráfica de los tiempos de relajación T_1 y T_2 a 4 MHz de muestras controles (Blanco) y muestras marcadas (Muestra) de células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral de individuos supuestamente sanos. Los datos mostrados representan el valor medio de 10 determinaciones.

El parámetro T_2 se revela como un mejor indicador, para identificar selectivamente las fracciones de células que expresan el EGF-R, ya que es capaz de detectar pequeñas variaciones en la red de spines.

Estos resultados muestran que es posible diferenciar selectivamente la población de células epiteliales que expresan el EGF-R *in vitro* utilizando el sistema de anticuerpos IgG murina anti EGF-R biotinilado y el IgG murina anti biotina conjugado con partículas magnéticas en una reacción "sandwich" mediante la medición de T_1 y T_2 a 4 MHz. Este resultado es muy importante ya que provee de una metodología factible *in vitro* para detectar células de interés y los marcadores moleculares específicos; además constituye la base para la aplicación del marcaje magnético en técnicas de imágenes de resonancia magnética.

Medición de los tiempos de relajación en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal de pacientes con lesiones premalignas

Las muestras de lesiones premalignas de la cavidad oral se agruparon por tipo de lesión en queratosis, leucoplasia y liquen plano.

Al comparar los tiempos de relajación T_1 y T_2 de las muestras marcadas y no marcadas de las regiones sanas de todos los pacientes con lesiones en la cavidad oral, se observó una disminución en T_1 y T_2 de un 23 % y 15 % respectivamente, $p=0.001$ en el cual representa diferencias altamente significativa (caso de $T_1 = 0.01$) para T_{α} y muy significativas (p_2 ; este resultado es consistente con el obtenido para individuos sanos ya que se obtuvo el mismo comportamiento.

En las muestras procedentes de la región lesionada, también se observó una disminución estadísticamente $p=0,05$) del tiempo de relajación de las muestras α significativa (marcadas respecto a las no marcadas, T_1 disminuye en un 43 % y T_2 en un 28 %, lo cual indica el marcaje selectivo de EGF-R.

Comparando los valores medios de los tiempos de relajación entre los blancos de la región sana y lesionada no se observan diferencias estadísticamente significativas para T_1 (disminución de solo el 8 %) y sí para T_2 (disminución de un 18 %) para $p = 0.05$, lo que sugiere que que T_{α} un nivel de significación de p_1 es menos susceptible al efecto de los fenómenos locales que aparecen como consecuencia de la presencia del ión paramagnético residual y los cambios en el agua intra y extracelular.

Comparando las medias de los valores de T_1 y T_2 de las células marcadas sanas y de la región lesionada de los pacientes encontramos una disminución del tiempo de relajación del 31 % y 15 % respectivamente, hallando diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$ [P1]); los resultados se muestran α gráficamente en la figura 2.

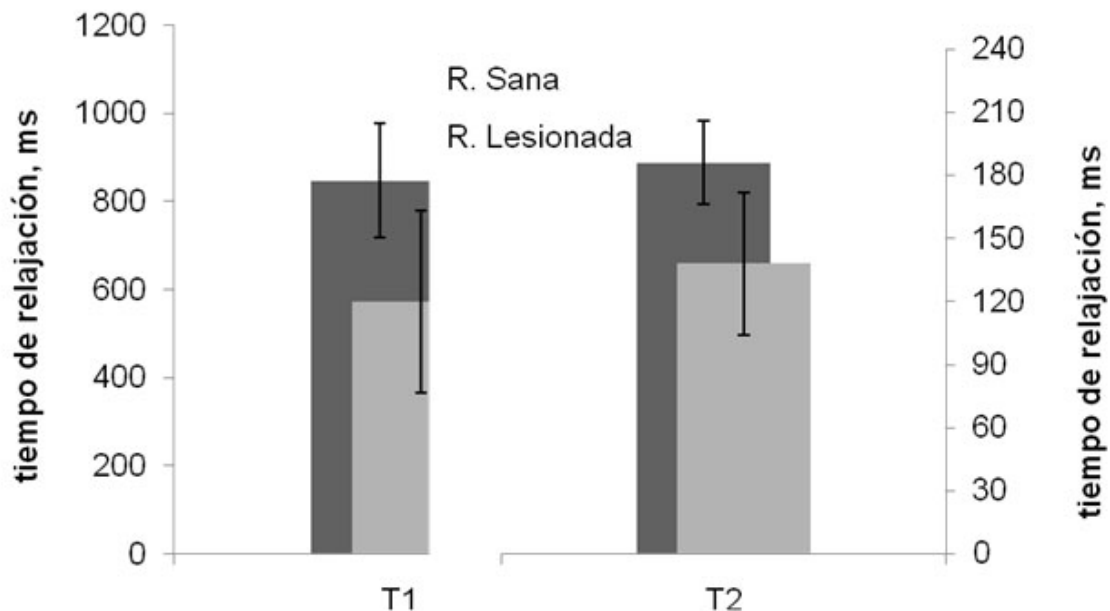


Fig. 2. Representación gráfica de los tiempos de relajación T_1 y T_2 a 4 MHz de células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral de tejido sano y lesionado marcadas magnéticamente. Los datos mostrados representan al valor medio de 10 determinaciones.

La comparación de los tiempos de relajación de las células sanas con los de cada una de las lesiones se muestra en la tabla 1. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de T_1 y T_2 de las células sanas respecto a las células de leucoplasias y liquen plano; no así con queratosis.

Al comparar de los valores de los tiempos de relajación entre los diferentes tipos de lesiones en células marcadas magnéticamente, utilizando la prueba de comparación múltiple de medias Kruskal-Wallis no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 1. Tiempos de relajación T_1 y T_2 a 4 MHz de cada grupo de muestras: células sanas, leucoplasia, queratosis y liquen plano

Tiempo de relajación	Células sanas	Células de queratosis	Células de leucoplasia	Células de liquen Plano
T1, ms	879 ± 230	764 ± 701 ns	542 ± 186**	444 ± 153*
T2, ms	205 ± 35	144 ± 80 ns	149 ± 46**	91 ± 16**

Comparación de los tiempos de relajación de las células sanas con las diferentes lesiones: (*) representa diferencias estadísticamente significativas, (**) representa diferencias estadísticamente muy significativas y (ns) representa diferencias no significativas.

DISCUSION

En la medición de los tiempos de relajación en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal de individuos sanos, las variaciones en los tiempos de relajación de las muestras respecto a los blancos observadas, están determinadas fundamentalmente, por la presencia del ión paramagnético de hierro, que al enlazarse a las células marcadas, reduce los tiempos de relajación, al crear inhomogenidad en el campo magnético local que aumentan el intercambio energético entre los núcleos de hidrógeno del agua, estas observaciones evidencian un mecanismo de relajación dipolo-dipolo, cuya contribución es muy importante en este tipo de muestras,¹⁷ donde la eficiencia del intercambio energético es mayor ente spin-spin que entre spin-retículo.

Otra teoría que explica estos resultados, es que al acoplarse el sistema de anticuerpos y partícula magnética a la célula epiteliales aumenta el volumen espacial de ésta lo cual disminuye su movilidad, aumenta su tiempo de correlación y por tanto la entropía del sistema.

Se observa una gran dispersión de los datos lo que revela la influencia de las condiciones experimentales (variabilidad biológica en cuanto a concentración celular, expresión de los EGF-R, etc.) en los valores obtenidos.

La disminución estadísticamente significativas de los tiempos de relajación muestra que es posible diferenciar selectivamente la población de células epiteliales que expresan el EGF-R *in vitro* utilizando el sistema de anticuerpos IgG murina anti EGF-R biotinilado y el IgG murina anti biotina conjugado con partículas magnéticas en una reacción "sandwich" mediante la medición de T_1 y T_2 a 4 MHz. Este resultado es muy importante ya que provee de una metodología factible *in vitro* para detectar células de interés y los marcadores moleculares específicos; además constituye la base para la aplicación del marcaje magnético en técnicas de imágenes de resonancia magnética.

Al comparar los tiempos de relajación T_1 y T_2 de las muestras marcadas y no marcadas de las regiones sanas y en las muestras procedentes de la región lesionada, de todos los pacientes con lesiones en la cavidad oral, se observó una disminución del tiempo de relajación, lo cual indica el marcaje selectivo de EGF-R; este resultado es consistente con el obtenido para muestras de individuos sanos y se observa que en la región lesionada, la caída de los tiempos de relajación es mayor que en la región sana, indicador de mayor expresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico en estas células,¹⁸ teniendo en cuenta que ambos experimentos fueron desarrollados en iguales condiciones. Los mecanismos moleculares que permiten explicar este comportamiento ya fueron discutidos anteriormente.

Al comparar los tiempos de relajación de las células sanas con los de cada una de las lesiones encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de T_1 y T_2 de las células sanas respecto a las células de leucoplasias y liquen plano, pero no con queratosis; estas diferencias se relacionan con la sobreexpresión del EGF-R. Está ampliamente descrito en trabajos previos el papel del EGF-R en la malignización de tejidos epiteliales,¹⁹ y que la sobreexpresión del mismo constituye un marcador tumoral ya que desencadena una serie de procesos moleculares que conducen a alteraciones en el ciclo celular.²⁰

Por otra parte, las células premalignas y malignas presentan un incremento del agua intracelular por unidad de volumen¹⁷ debido al desequilibrio en el metabolismo y en el ciclo celular que sufren estas células, además se incrementa el agua asociada a la membrana por los cambios en la composición y estructura de la misma, como el incremento de la densidad de carga negativa en la superficie celular, lo cual aumenta la probabilidad de que se enlace el agua del medio extracelular por interacciones electrostáticas; que a su vez, induce una disminución de los tiempos de relajación.

Otra alteración funcional que se evidencia en tejidos premalignos y malignos es la transcripción indiscriminada de muchos oncogenes, que conlleva a la producción excesiva de proteínas tumorales dentro de la célula, aumentando la probabilidad de asociación del agua a dichas moléculas y disminuyendo por tanto los tiempos de relajación.¹⁷

Los resultados muestran que existe sobreexpresión del EGF-R en células epiteliales de la mucosa bucal en lesiones como leucoplasias y liquen plano; al existir más EGF-R hay más sitios libres para la unión del sistema de anticuerpos conjugados con el ión paramagnético lo cual disminuye la movilidad del sistema y por tanto disminuyen de los tiempos de relajación T_1 y T_2 .

En el caso de la queratosis no se encuentran diferencias en los niveles de expresión del EGF-R respecto a las células sanas probablemente porque es el tipo de lesión con menos porcentaje de malignización y dicha transformación se asocia en mayor medida a otros procesos moleculares como la queratinización y no a la sobreexpresión del EGF-R; por otra parte el principal factor de riesgo para la aparición de las queratosis es la acción mecánica de prótesis mal adaptadas y malformaciones de los dientes ²¹ y no ha sido descrito en la literatura la sobreexpresión del EGF-R en este tipo de lesiones.

Se demuestra que la técnica de relajación magnética protónica es capaz de detectar la sobreexpresión del EGF-R en lesiones premalignas de la cavidad bucal. El máximo valor descrito de sobreexpresión correspondiente a carcinomas orales es de 16 % por técnicas inmunofluorescentes. ²² En el caso de las lesiones premalignas no se ha descrito la sobreexpresión del receptor aunque es lógico suponer que exista por el grado de malignización que presentan algunas de estas lesiones y el papel del EGF-R en la malignización de tejidos epiteliales.

Con los resultados obtenidos, comprobamos que es posible detectar células epiteliales que expresen el EGF-R in vitro por relajación magnética protónica a 4 MHz, utilizando un sistema de anticuerpos y partículas magnéticas, a través de la medición de T1 y T2, y es posible diferenciar células epiteliales sanas de células premalignas (leucoplasias y líquen plano) por la sobreexpresión del EGF-R, determinada indirectamente a través de los tiempos de relajación magnética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pavlova I, Williams MD, El-Naggar A, Richards-Kortum R, Gillenwater A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high resolution fluorescence microscopy in viable tissue. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8): 2396-2404.
2. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Diseases* 2000; 6(29): 65-74.
3. Epstein JB, Gorsky M, Cabay RJ, Day T, Gonsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma: Role of primary care physicians. *Can Fam Physician* 2008; 54(6): 870-875.
4. Schwarz RA, Gao W, Redden Weber C, Kurachi C, Lee JJ, El-Naggar AK *et al.* Noninvasive evaluation of oral lesions using depth-sensitive optical spectroscopy. *Cancer* 2009; 115(8): 1669-79.
5. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(1): 1-10.
6. González MA, Gil JA, Ruiz I. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Avances en odontoestomatología* 2008; 24(1): 55-60.

7. Sano D, Choi S, Milas ZL, Zhou G, Galer CE, Su YW, *et al.* The Effect of Combination Anti-Endothelial Growth Factor Receptor and Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Targeted Therapy on Lymph Node Metastasis: A Study in an Orthotopic Nude Mouse Model of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Apr; 135(4):411-420.
8. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med.* 2003 May; 32(5):251-256.
9. Gillenwater A, Papadimitrakopoulou V, Richards-Kortum R. Oral premalignancy: new methods of detection and treatment. *Curr Oncol Rep.* 2006;8:146-154.
10. Jesper R. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance for clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003; 14(1):47-62.
11. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007;36(10):575-80.
12. Chen AY, Myers JN. Cancer of the oral cavity. *Dis Mon.* 2001;47:275-361.
13. Soukos NS, Hamblin MR, Keel S, *et al.* Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61:4490-4496.
14. Pico MC, Giraldo IG, Otero A. *Inmunología Experimental.* La Habana (Cuba): Editorial Felix Varela; 1997.p.246-275.
15. PIERCE Biotechnology Inc. Instructions EZ-Link® NHS-Biotin Reagents. PIERCE Biotechnology Inc 9/2004 [publicación en línea] 2004 [fecha de acceso: 22 Dic 2012]; 9. Disponible en: <http://www.piercenet.com>.
16. Miltenyi Bistec Inc. Instructions MACS Magnetic Cell Sorting with indirect MicroBeads. Miltenyi Bistec Inc, USA [publicación en línea] 2007 [fecha de acceso: 22 Dic 2012]. Disponible en: <http://www.miltenyibiotec.com>.
17. Lores M, Rodrigues Y, Pérez E. Evaluación de las potencialidades de la relajación magnética nuclear para el estudio, a baja frecuencia, del cáncer de mama *in vitro*. *Revista Cubana de Química* 2002; 14(3):3-10.
18. Christensen JG, Schreck RE, Chan E, Wang X, Yang C, Liu L, *et al.* High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGFR) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGFR phosphorylation *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2001,7:4230-38.
19. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993;4(1):121-33.

20. Jorrissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* 2003;281(1):31-53.
21. Tarakji B, Kujan O, Nassani MZ. An immunohistochemical study of the distribution of p 16 protein in oral mucosa in smokers, non-smokers and in frictional keratosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15(5):681-4.
22. Werkmeister R, Brandt B, Joos V. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36:100-5.

Recibido: 5 de octubre de 2013.

Aceptado: 3 de enero de 2014.

MSc. Yamirka Alonso Geli. Investigador Agregado, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Altos de Quintero, Santiago de Cuba, Cuba. Teléfonos: (53)(22) 631424-631425, Fax: (53)(22) 634525. E mail: yalonso09@gmail.com