

Trabajo Final de carrera

Virus Papiloma Humano en cavidad oral

Ginette Moyano

Tutora:

Dra. Correa, Rita Mariel

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Malbrán"



2021

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Agradecimientos

Principalmente agradecerles a mis papas, por apoyarme incondicionalmente desde el primer día en que decidí estudiar esta hermosa carrera.

A todo el grupo de Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán, por ser un gran modelo de profesionales a seguir. A Alejandra por brindarme la oportunidad y el espacio para poder realizar este trabajo. Gracias a Celeste, Valeria, Jorge, Karina, Dolores, Cristian y Florencia por enseñarme todas las cosas con las que hoy cuento, por la paciencia y por el hermoso clima de trabajo que siempre hay en este laboratorio, del cual me llevo una hermosa experiencia. También agradecerle a Daniela y Agustín, quienes me ayudaron y enseñaron sobre su excelente trabajo en el laboratorio; y a Sara, por la gran ayuda y enseñanza que me brindó. Pero especialmente quiero agradecerle a mi tutora Mariel, por siempre enseñarme, estar presente en cada ocasión que lo necesité y en todo momento ayudarme siempre con una sonrisa y la enorme calidez que la caracteriza.

A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, quienes siempre me apoyaron con mucho cariño; y a mi novio, agradecerle de todo corazón, porque desde que lo conozco siempre me alentó y ayudó en poder trabajar y finalizar esta tesis.

A mis amigos de toda la vida; y también a todos mis compañeros de la facultad por hacer mas hermoso el transitar de la carrera. Gracias por el gran compañerismo de siempre, los mates, desayunos y las experiencias que compartimos como futuros biólogos llenos de ilusiones y ganas de aprender.

Y por ultimo, gracias a todos los profesores de la facultad que, con cada clase hicieron que me enamore de la biología cada vez mas, en todas sus áreas.

Índice

Abreviaturas	4
Resumen	6
1. Marco Teórico o Antecedentes	7
1.1. Breve reseña histórica sobre los papilomavirus y su asociación con el cáncer en humanos	7
2. Introducción	8
2.1. El virus: estructura y organización genómica	8
2.2. Taxonomía	11
2.3. Patogenia	12
2.4. Historia natural de la infección del virus y carcinogénesis asociadas a HPV	13
2.5. Epidemiología	16
3. Objetivos	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. Hipótesis de trabajo	19
5. Materiales y métodos	20
5.1. Diseño del estudio, población y muestras	20
5.1.1. Comité de ética	20
5.1.2. Diseño	20
5.1.3. Población y muestras	20
5.2. Parte Experimental	22
5.2.1. Procedimiento de corte de tacos de biopsias	22
5.2.2. Desparafinización.....	24
5.2.3. Extracción y purificación	24
5.2.4. Lectura del ADN obtenido	25
5.3. Métodos	25
5.3.1. Detección y genotipificación	25

5.3.1.1. Detección de genotipos de HPV del género alfa, mediante el sistema de cebadores BSGP5+/6+Bio.....	26
5.3.1.2. Hibridación Reversa en Línea	26
5.3.1.3. Amplificación de la beta globina humana	31
5.2. Análisis estadístico	31
6. Resultados	32
7. Discusión	38
8. Conclusiones	43
9. Bibliografía.....	44
10. Anexos	54

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BPV	<i>Virus del papiloma bovino (del inglés, bovine papillomavirus)</i>
CCE	Cánceres de células escamosas
CCE-CO	Cánceres de células escamosas de la cavidad oral
CCU	Cancer de cuello de útero
CO	Cavidad oral
CP	Control positivo
E	Región temprana (del inglés Early)
EDTA	Ácido etilendiamintetra-acético
	Biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina (del inglés, formalin fixed paraffin embedded)
FFPE	
Fig.	Figura
<i>HEADLAcE</i>	Biomarkers of HEAD and neck cancer in Latin America and Europe
HPV	<i>Virus del papiloma humano; del inglés human papiloma virus</i>
HPV-AR	HPV de alto riesgo
HPV-BR	HPV de bajo riesgo
	Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (del inglés, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IARC	
IC	Intervalo de confianza
	Comité Internacional de Taxonomía de Virus (del inglés, <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
ICTV	
INEI	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ITS	Infecciones de transmisión sexual
L	Región tardía (del inglés Late)
LCR	Región larga de control (del inglés, <i>Long Control Region</i>)
min	Minutos
NCR	Región no codificante (del inglés, <i>non-codifying regions</i>)
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés, <i>Open Reading Frame</i>)
Ori	Origen de replicación

pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RLB	PCR combinada con Hibridación Reversa en línea; inglés <i>Reverse Line Blotting</i>
pH	Potencia de hidrógeno
PV	Papilomavirus
RLB	Hibridación Reversa en línea (del inglés, <i>Reverse Line Blotting</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSPE	Buffer EDTA-CLNa- Fosfatos
URR	Región reguladora aguas arriba (del inglés, <i>upstream regulatory region</i>)
VF	Volumen final
μl	Microlitros
°C	Grados Celsius

Virus Papiloma Humano en cavidad oral

Resumen

Actualmente los cánceres localizados fuera del tracto anogenital, tiene una incidencia del 12% del total de cánceres asociados a HPV, siendo el 2% correspondiente a los Cánceres de Células Escamosas de Cavidad Oral (CCE-CO). En Argentina, cada año hay 1.300 nuevos casos de CCE-CO, y son la causa de aproximadamente 500 muertes por año. Si bien existen algunos estudios que sugieren un rol etiológico del HPV en el CCE-CO, la escasez de información mantiene controversia; por lo tanto, es de sumo interés profundizar el conocimiento en este campo de alto impacto sanitario. El objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar la infección por virus papiloma humano en CCE-CO en nuestro medio.

Se planteó un estudio descriptivo transversal y retrospectivo sobre biopsias con diagnóstico histológico correspondiente a CCE-CO. La detección y genotipificación de HPV se hizo mediante PCR con posterior hibridación reversa (PCR-RLB), para identificar 36 genotipos de alto riesgo oncogénico (HPV-AR) y bajo riesgo oncogénico (HPV-BR), presentes en infecciones simples o múltiples. En las muestras que resultaron aptas para el análisis (N=183), el DNA de HPV fue detectado en el 9,83%; no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a edad y sexo en las muestras HPV positivas. El 94,4% de las infecciones correspondió a infecciones simples, identificándose HPV-AR en el 88,2 % de ellas. El HPV16 (33,3%) fue el genotipo más frecuentemente detectado .

En conclusión, este estudio brindó información valiosa sobre la frecuencia y la distribución de genotipos de HPV en CCE-CO en nuestro medio y sumó evidencia en cuanto a la alta positividad para HPV16 en estas neoplasias. La formación del Consorcio Argentino para el Estudio de HPV en Cánceres de Cabeza y Cuello, permitió el acceso a una adecuada cantidad de muestras y demostró la riqueza de un trabajo multidisciplinario realizado mediante la interacción entre especialistas de distintas áreas de la biomedicina.

Palabras claves: Virus papiloma humano - Genotipos de HPV - Cavidad Oral - Carcinoma de Células Escamosas

Abstract

Currently, cancers located outside the anogenital tract have an incidence of 12% of all cancers associated with HPV, 2% of them corresponding to Squamous Cell Cancers of the Oral Cavity (SCC-CO). In Argentina, every year there are 1,300 new cases of CCE-CO, and they are the cause of approximately 500 deaths per year. Although there are some studies that suggest an etiological role of HPV in OC-SCC, the paucity of information remains controversial; Therefore, it is of great interest to deepen our knowledge in this field of high health impact. The objective of this thesis was to study human papillomavirus infection in SCC-CO in our environment.

A descriptive, cross-sectional and retrospective study was proposed on biopsies with histological diagnosis corresponding to SCC-CO. The detection and genotyping of HPV was done by PCR with subsequent reverse hybridization (PCR-RLB), to identify 36 genotypes of high oncogenic risk (HPV-

AR) and low oncogenic risk (HPV-BR), present in single or multiple infections. In the samples that were suitable for analysis (N = 183), HPV DNA was detected in 9.83%; no statistically significant differences were observed in relation to age and sex in the positive HPV samples. 94.4% of the infections corresponded to simple infections, with HPV-AR being identified in 88.2% of them. HPV16 (33.3%) was the most frequently detected genotype .

In conclusion, this study provided valuable information on the frequency and distribution of HPV genotypes in SCC-CO in our environment and added evidence regarding the high positivity for HPV16 in these neoplasms. The formation of the Argentine Consortium for the Study of HPV in Head and Neck Cancers, has obtained access to an adequate number of samples and demonstrated the richness of a multidisciplinary work carried out through the interaction between specialists from different areas of biomedicine.

Keywords: Human Papillomavirus - HPV Genotypes - Oral Cavity - Squamous Cell Carcinoma

1. Marco Teórico o Antecedentes

1.1 Breve reseña histórica sobre los papilomavirus y su asociación con el cáncer en humanos.

Las infecciones por el virus papiloma humano (HPV, del inglés *human papillomavirus*) han sido referidas por los antiguos griegos y romanos, en especial en su forma clínica más característica representada por las verrugas; a partir de allí, el interés en el estudio de los HPV fue atravesando distintas etapas a lo largo de los años.

A partir de 1970, con el advenimiento de las técnicas de ingeniería genética, entre ellas el clonado, las investigaciones fueron impulsadas y se alcanzaron notables logros. El análisis de los ADN virales permitió el reconocimiento de varios genotipos de HPV; así, se identificaron virus causantes de verrugas cutáneas (Gissmann y col., 1977; Orth y col., 1977); también fueron aislados los tipos asociados con las verrugas genitales (Gissmann y zur Hausen, 1980; Orth y col., 1978) y a partir de biopsias se identificaron los genotipos causantes de cáncer (Durst y col., 1983). Estos hallazgos, pusieron en evidencia la existencia de un gran número de genotipos de HPV, como ha sido confirmado en los años posteriores.

Hacia fines de los '70 y principios de los '80, se reconoció la importancia clínica de estos virus; en particular, se fue fortaleciendo la sospecha de una asociación etiológica entre ciertos genotipos de HPV y el cáncer de cuello de útero (CCU) (zur Hausen, 1976; Gissmann y zur Hausen, 1980). Numerosas evidencias a favor de esta relación causal se fueron sumando los siguientes años, entre las que se destacan las aportadas por Harald zur Hausen (Instituto Alemán de Investigación sobre Cáncer), que lo hicieron merecedor del Premio Nobel en Medicina en el año 2008.

En la década del 80, se publicaron los primeros estudios que proponían la participación del HPV en un subconjunto de cánceres orales. (Syrjänen et al. 1983; Abramson, 1989), siendo el puntapié inicial para la investigación en este tema, en los años siguientes.

La suma de los datos epidemiológicos y experimentales obtenidos de las numerosas publicaciones permitió en el año 1995, a la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) elaborar un documento estableciendo que ciertos genotipos de HPV son carcinogénicos en humanos, y señalando a la infección persistente por los HPV-AR como un factor necesario para la génesis del CCU (IARC, 1995; Bosch et al., 2002). Esto marcó un hito, señalando a la infección por HPV como condición necesaria para el desarrollo del tumor, abriendo la posibilidad del desarrollo de vacunas y sistemas de tamizaje virológico; asimismo, despertó el interés de la comunidad científica para investigar la posible asociación de estos virus con cáncer en epitelios de localización extracervical, e incluso extra genital, como la cabeza y el cuello. En línea con esto, hace un poco más de una década, la IARC reconoció al HPV16 como agente etiológico de un subgrupo de cánceres de cabeza y cuello, como es el caso de los cánceres de orofaringe (IARC, 2007).

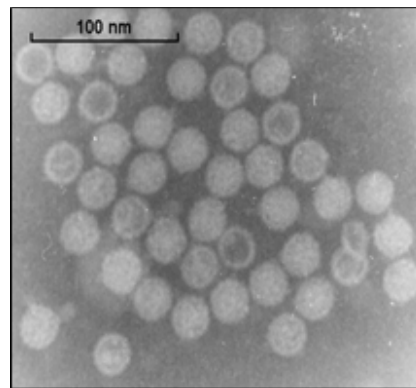
2. Introducción

2.1 El virus: estructura y organización genómica

Los papilomavirus (PV) son virus pequeños sin envoltura de aproximadamente 55 nm de diámetro (Fig.1). El virión se constituye por una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros, que contiene un ADN circular doble cadena asociado a histonas, de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb). De una sola de las cadenas del ADN se transcribe el genoma activamente (Fields et al. 2007).

Figura 1.

Microfotografía de la partícula viral.



Nota. Microfotografía adaptada perteneciente al Instituto Malbrán.

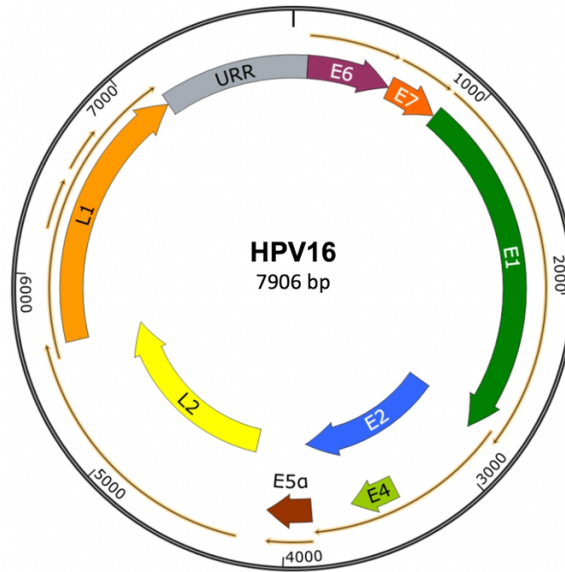
El genoma viral comprende tres regiones (Fig. 2):

- La región temprana o E (del inglés *Early*) contiene hasta seis marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frame*) que codifican proteínas reguladoras virales. Cada ORF en la región inicial se designa "E" seguido de un número, indicativo de la longitud del ORF.
- La región tardía o L (del inglés *Late*) codifica las dos proteínas de la cápside viral L1 y L2 facilitadoras del empaquetamiento y la maduración del ADN viral.
- La región de control larga o LCR (del inglés *Long Control Region*), también se la denomina región reguladora aguas arriba (URR, del inglés *upstream regulatory region*) o región no codificante (NCR, del inglés *non-coding regions*) (Harden & Munger, 2017). Contiene el origen de la replicación del ADN, así como los sitios de unión para proteínas virales y celulares del hospedador para controlar la transcripción viral (Fields et al. 2007; Burd, 2016).

En la tabla 1 se detallan los genes y las funciones de las proteínas codificadas y la LCR.

Figura 2.

Organización genómica de HPV16



Nota. El esquema representa el ADN de doble cadena circular. E: proteínas tempranas, L: proteínas tardías (adaptado de Christensen, 2016).

Tabla 1.

Funciones de las proteínas de HPV y de la región no codificante (LCR).

ORF	Función proteica
E1	Replicación viral y transcripción del ADN viral.
E2	Replicación del ADN viral, segregación de los episomas virales, apoptosis y regulación de la transcripción de E5 y E7
E4	Replicación del ADN viral. Relacionada con la maduración y la liberación del virus.
E5	Proliferación celular, reconocimiento inmunitario y apoptosis.
E6	Degradación de p53, alteración de la regulación del ciclo celular, resistencia a la apoptosis cromosómica, inestabilidad e inmortalización celular.
E7	Degradación de pRB, sobreexpresión de p16, inestabilidad cromosómica.
L1	Proteína estructural, constituyente mayor de la cápside.
L2	Proteína estructural, constituyente menor de la cápside.
Región no codificante	
LCR	Origen de replicación (Ori), sitios de unión a proteínas reguladoras de la transcripción y sitios de iniciación de la transcripción.

ORF: marco de lectura abierto (del inglés, *Open Reading Frame*).

2.2. Taxonomía

Los PV son muy diversos y se han aislado virus de una variedad de mamíferos, aves y reptiles no aviarios (Bernard et al., 1994). Se nombran de acuerdo al hospedador que infectan; por lo que el HPV (del inglés, *human papilloma virus*), es el virus que infecta al humano, el BPV (del inglés, *bovine papillomavirus*), es el virus que infecta al bovino, etc.

A partir del año 2004, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (del inglés, *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) reconoció formalmente a la familia *Papillomaviridae* y se propuso una nueva clasificación de los PV en base a la identidad nucleotídica del gen que codifica la proteína mayor de la cápside L1. Esta familia está compuesta por géneros (nombrados con letras griegas), especies (nombradas con números arábigos), tipos (nombradas con números arábigos), subtipos (nombrados con letras minúsculas) y variantes. Cuando se comparan las secuencias de un alto número de PV uno puede observar la formación de un árbol filogenético, organizados en 16 géneros (Fig. 3) (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010).

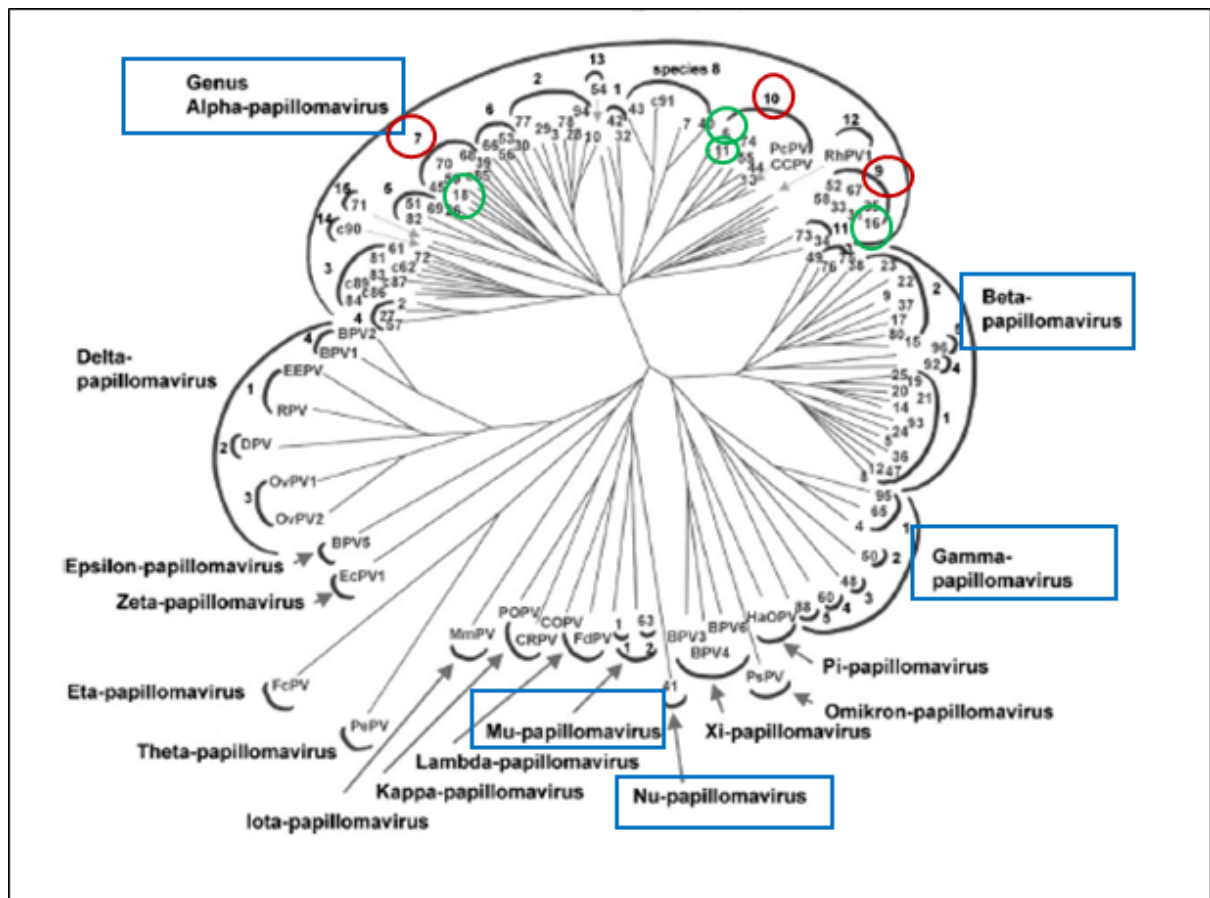
Cada nuevo tipo viral se nombra con números correlativos siguiendo el orden cronológico de acuerdo al momento de su identificación. El criterio que se considera es el siguiente:

- Un nuevo tipo viral es aquel que presenta una secuencia nucleotídica que difiere en más de un 10% en la región L1 con respecto a tipos preestablecidos.
- Un subtipo es aquel cuya secuencia nucleotídica difiere entre 2-10% de homología en la región L1.
- Una variante intratípica, es aquella cuya secuencia nucleotídica presenta variaciones de hasta un 2%. (Bernard et al., 2010; Van Doorslaer et al., 2011).

En lo que respecta a los HPV, actualmente, existen algo más de 220 genotipos descritos y cientos de nuevos candidatos que están siendo estudiados y secuenciados (International Human Papillomavirus-Reference Center, 2021). Los distintos genotipos virales, están distribuidos en los 5 géneros actualmente definidos en humanos: α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus y ν -papillomavirus (de Villiers et al., 2004). (Fig 3).

Figura 3.

Árbol filogenético de los papilomavirus.



Nota. Adaptado de: de Vililers et al., 2004. Se señalan con recuadros azules los 5 géneros que infectan a humanos. A modo de ejemplo, se indican con círculos rojos algunas de las especies pertenecientes al α -género y con círculos verdes algunos de los genotipos virales que infectan las mucosas, dentro de la especie.

2.3. Patogenia

El HPV se encuentra ampliamente distribuido en la población; infectando piel y mucosas y produciendo lesiones epiteliales proliferativas (verrugas) que por lo general son autolimitadas por el hospedador (Howley & Lowy, 2007).

Los HPV que infectan las mucosas pertenecen al género alfa, y han sido divididos de acuerdo a su potencial oncogénico (Tabla 2) en:

1. HPVs de bajo riesgo oncogénico (HPV-BR) presentes en lesiones benignas (verrugas y otras lesiones de bajo grado) con mínimo riesgo a la progresión maligna.
2. HPVs de alto riesgo oncogénico (HPV-AR), los cuales bajo la forma de una infección persistente pueden conducir a un cáncer. (Muñoz et al., 2003).

Tabla 2

Clasificación de los HPV mucosotropos de acuerdo a su potencial oncogénico.

HPV Alto riesgo	HPV Probable alto riesgo	HPV Bajo riesgo
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 53, 66, 68, 73, 82	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

Nota. Adaptado de (Castle et al., 2010; Muñoz et al., 2006, 2003).

2.4 Historia natural de la infección del virus y carcinogénesis asociada a HPV

La infección genital por HPV es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes; se estima que un 80% de las mujeres y hombres se infectarán con uno o varios genotipos de HPV a lo largo de sus vidas. Los principales factores de riesgo de infección son la edad temprana de inicio de relaciones sexuales, el número de parejas y su conducta sexuales (de Sanjosé et al., 2018).

Si bien la historia natural de las infecciones orales por HPV no está totalmente esclarecida, diferentes estudios sugieren una cierta similitud con lo que sucede en el cérvix. Existe fuerte evidencia que la principal vía de entrada del virus a nivel de las vías aerodigestivas superiores, sería el contacto sexual oral (Chung et al., 2014; Faraji et al., 2017; Hübbers & Akgül, 2015).

La transmisión del virus se produce por contacto directo con la piel o las mucosas infectadas, a través de lesiones y microabrasiones del epitelio siendo la vía sexual la forma más común de transmisión. En el caso de los HPV anogenitales, la infección se produce principalmente por contacto sexual (Bosch et al., 2008; Doorbar, 2007; Stanley, 2012).

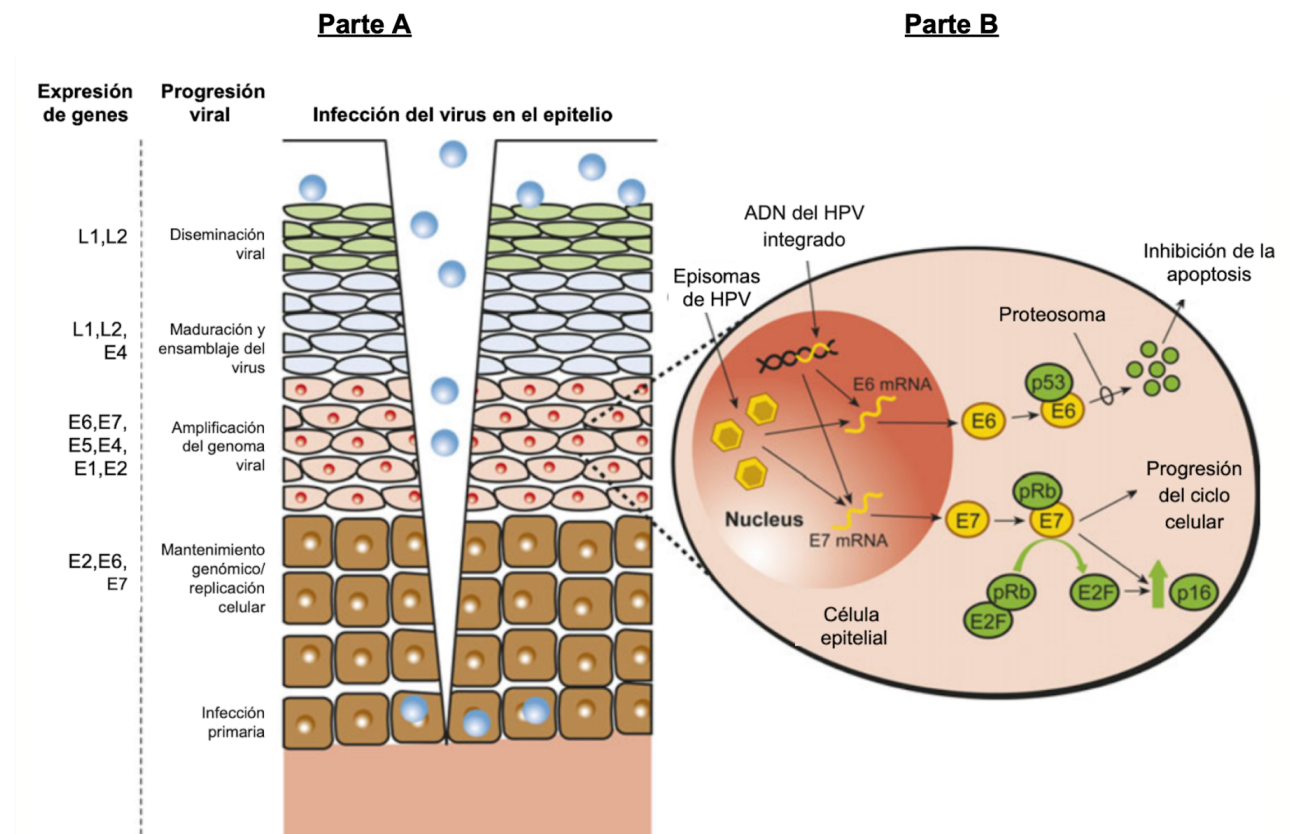
El virus ingresa en el epitelio al interior de las células basales del mismo. A partir de allí, se llevan a cabo una serie de procesos donde se promueve la transcripción de los genes tempranos virales que permiten el establecimiento y el mantenimiento del genoma viral en el núcleo de la célula como un episoma, en bajo número de copias. Estos episomas replican de manera coordinada con los cromosomas de la célula hospedadora. La replicación viral vegetativa permite la amplificación génica del virus; la expresión de los genes tardíos y el ensamblado de los viriones se producen en el núcleo

de las células más diferenciadas que se encuentran en las capas más superficiales del epitelio. De esta forma se mantiene de manera estable un reservorio de genomas de HPV en la capa basal del epitelio a través de la generación continua de células hijas infectadas y por lo tanto de progenie viral (Laimins, 1998). (Fig. 4, parte A).

La infección persistente por HPV-AR está asociada etiológicamente al desarrollo de los CCU; también se vincula, con el desarrollo de neoplasias extracervicales, tales como: cáncer vulvar (~50%), cáncer vaginal (~65%), cáncer de pene (~40%), cáncer anal (~95%) y neoplasias extragenitales como los cánceres de cabeza y cuello, particularmente los orofaríngeos (~60%). (CDC, 2020).

Figura 4.

Representación esquemática de la progresión de la infección y de la expresión de los genes virales durante el proceso de diferenciación del epitelio escamoso.



Nota. Adaptado de Syrjänen, 2018.

En el caso de las infecciones que se asientan en la cabeza y el cuello, la anatomía es compleja, destacándose diferentes localizaciones: la cavidad oral, la orofaringe, la laringe, las glándulas salivales y la cavidad nasal, entre otros (Fig. 5).

Los cánceres de la cabeza y el cuello difieren no sólo en su anatomía, sino también en la epidemiología, historia natural, etc. En su mayoría (~90%), estas neoplasias, se inician en las células escamosas que revisten la superficies húmedas y mucosas del interior de la cabeza y el cuello, de allí su denominación de carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello (CCE-CC). Estos cánceres constituyen un grave problema, no sólo por su notable agresividad, sino también por la complejidad anatómica de la región donde se originan y desarrollan (cérvico-facial), dejando habitualmente graves secuelas funcionales y estéticas (Westra y col., 2015).

Particularmente, la cavidad oral (CO), localización anatómica motivo de estudio de esta tesis, comprende diferentes subsitios dentro de la boca: carrillo, mucosa labial, encía, piso de boca, triángulo retromolar, lengua, paladar duro (Fig.5).

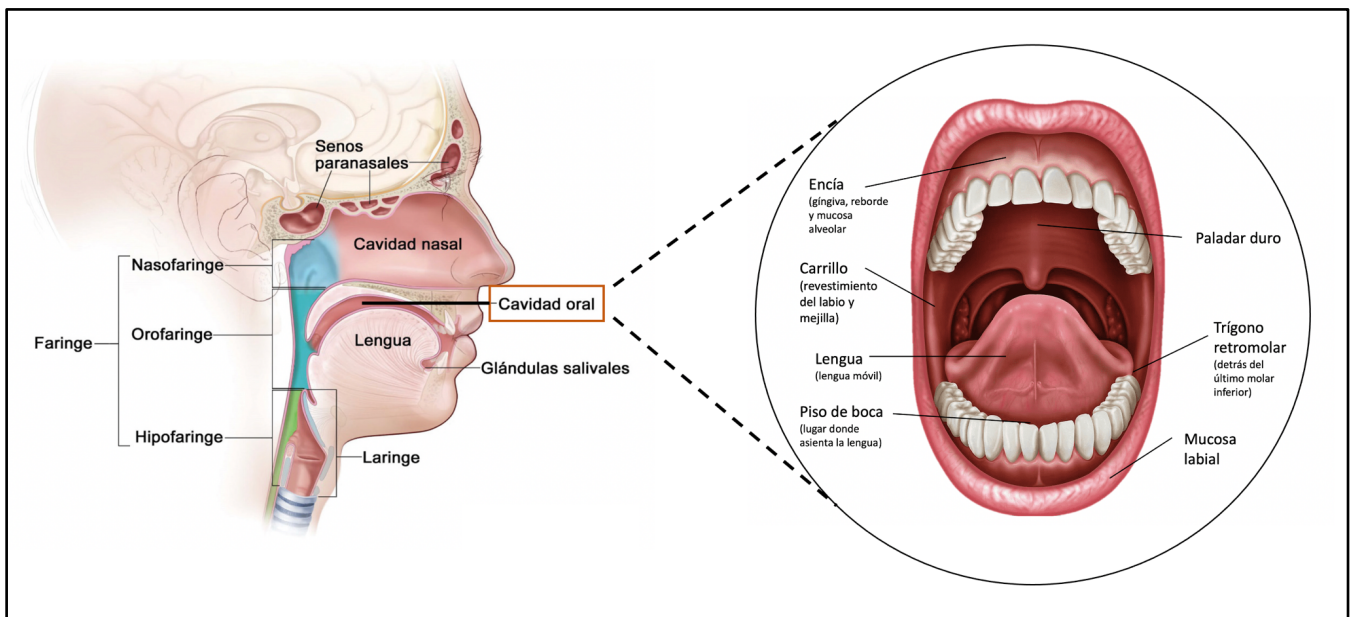
De manera similar a lo que sucede en el tracto anogenital, donde el virus está asociado a un amplio espectro de lesiones que abarcan las lesiones benignas, premalignas y carcinomas, en la CO, las lesiones asociadas a HPV también comprenden una variedad clínica que incluye las lesiones benignas o malignas, visibles o no visibles, la mayoría asintomáticas, que pueden persistir o desaparecer de manera espontánea.

Entre las lesiones orales asociadas a la infección por HPV, cabe destacar (Lingen et al., 2017):

- Benignas más comunes que se presentan en la boca son: verrugas vulgares, papilomas bucales, hiperplasias epiteliales focales, liquenes planos bucales;
- Preneoplásicas: eritroplasias y leucoplasias atípicas;
- Carcinoma de células escamosas.

Figura 5.

Detalle de las localizaciones anatómicas en la región de la cabeza y el cuello.



Nota. Adaptado de NIH, 2018.

La carcinogénesis por HPV está basada en la capacidad que muestran las oncoproteínas virales E6 y E7 de los HPV-AR de interferir en el control de la proliferación celular. En las lesiones preneoplásicas severas y los cánceres, el ADN viral se encuentra integrado al genoma de la célula infectada. Este evento involucra la ruptura del gen viral E2, conduciendo a una sobreexpresión de E6 y E7. La proteína E6 de HPV-AR se une a un sin número de blancos celulares, entre los que se encuentran la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo de esta manera la apoptosis, interfiriendo con la diferenciación celular e induciendo transformación celular en las células infectadas (Scheffner et al., 1993; Vande Pol & Klingelutz, 2013). Por otro lado, E7 de HPV-AR se une y degrada la proteína supresora de tumores de retinoblastoma, pRB, interrumpiendo su interacción con el factor de transcripción E2F; la liberación y activación de E2F da como resultado la expresión de genes en fase S y la progresión del ciclo celular; por otro lado conduce a la liberación del gen p16^{INK4A} de su inhibición transcripcional; como consecuencia la proteína p16^{INK4A} se sobreexpresa y por lo tanto se acumula. (Syrjänen, 2018) (Fig. 4, parte B).

La similitud entre las características morfológicas de las lesiones inducidas por el HPV en el tracto anogenital y la boca, así como las semejanzas en la afinidad por las células epiteliales y el potencial oncogénico viral han despertado el interés del estudio del rol viral en la localización oral.

2.5 Epidemiología

A nivel global, se registró en el 2018 que los CCE-CC contribuyen con un poco más de 370.000 nuevos casos y más de 177.000 muertes cada año, según GLOBOCAN; siendo el sexto cáncer más común en todo el mundo (Ferlay et al., 2018; Bray et al., 2018; Serna et al., 2020). Según datos de la IARC, la incidencia estimada en la Argentina es de 3.200 casos por año, mientras que la mortalidad anual es de alrededor de 1.900 (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Diversos estudios epidemiológicos muestran que estos tumores se presentan más frecuentemente en pacientes más jóvenes, y preferentemente en el género masculino (La Vecchia et al., 1997; Candotto et al., 2017; Mirghani et al., 2018; Serna et al., 2020).

Estas neoplasias se asocian principalmente con el hábito de fumar y el consumo excesivo de alcohol. En las últimas décadas, se ha observado una disminución en la incidencia de esta patología en países desarrollados, debido probablemente a la mayor conciencia en relación al consumo de tabaco y alcohol; sin embargo, la proporción de cánceres principalmente de orofaringe, ha aumentado en EEUU y Europa (Chaturvedi et al., 2011). Publicaciones recientes atribuyen este fenómeno, al menos en parte, a un aumento en la prevalencia de la infección oral de HPV (Fakhry et al., 2017); en línea con esto, se continúa aportando evidencias a favor de un rol etiológico de los HPV-AR, en particular el HPV16, en un subgrupo de CCE-CC, principalmente orofaríngeos. Desde el punto de vista clínico, los pacientes con cáncer orofaríngeo HPV positivo mostrarían mejor pronóstico, mejor respuesta al tratamiento, y mayor supervivencia que los portadores de tumores HPV negativos. (Ang et al., 2010; Swiecicki et al., 2016; Westra and Lewis, 2017).

Se han informado diferencias en la proporción de cánceres de CCE-CC HPV positivos en las diferentes localizaciones anatómicas de la cabeza y el cuello, observándose una mayor frecuencia de HPV en tumores orofaríngeos (30-60%) que en carcinomas CO (0-23,4%) o laríngeos (10-24%), siendo el HPV16 el genotipo predominante en todos los casos (Kreimer et al. 2005; Dayyani et al., 2010; Syrjanen, 2018; Gotz et al., 2018; Tumban, 2019).

Por otro lado, numerosas publicaciones han observado variaciones en las frecuencias de HPV encontradas entre las distintas regiones geográficas; así, la frecuencia de los cánceres orofaríngeos encontrada en América del Norte es más alta (>60%) que en Europa y Asia (40%); mientras que, la proporción de cánceres cavidad oral HPV positivos en Asia es mayor (~40%) en comparación con América del Norte y Europa (10- 20%). En América Latina en general y en nuestro país en particular los datos de prevalencia de HPV en estas neoplasias, provenientes en general, de estudios llevados a cabo por consorcios internacionales, son más limitados (Gonzalez et al., 2007; Gillison et al., 2000; Franceschi et al., 2000; Mehanna et al., 2013; Castellsagué y col., 2016; de Martel 2017; Anantharaman et al., 2017).

Particularmente, en los cánceres de células escamosas de cavidad oral (CCE-CO), se han informado distintas frecuencias de HPV en las diferentes sublocalizaciones dentro de la boca,

dependiendo se trate de la lengua, paladar, encía, piso de boca, variando entre un 20-50% dependiendo del subsitio anatómico (Abreu et al., 2017; Yete et al., 2017; Candotto et al., 2017). Las evidencias epidemiológicas, muestran que los HPV-AR, particularmente los HPV16 y 18, son más prevalentes en estas neoplasias, en comparación con otros HPV-AR (Jiang & Dong, 2017; Anantharaman et al., 2017).

En Argentina, cada año se detectan 1.300 nuevos casos de CCE-CO, provocando la muerte de aproximadamente 500 personas por año. (Bray et al., 2018; Serna et al., 2020). Datos previamente publicados en lesiones orales en nuestro país, mostraron que los HPV6 y 11 son los más comunes en lesiones benignas, mientras que el HPV16 fue el genotipo más frecuente en cánceres orales, aunque el número de muestras fue muy limitado (González y col., 2007).

Si bien existen algunos estudios que sugieren un rol etiológico del HPV en el CCE-CO, la escasez de información mantiene una controversia; por lo tanto, es de sumo interés profundizar el conocimiento en este campo de alto impacto sanitario.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

- Estudiar la infección por virus papiloma humano en cánceres de células escamosas de la cavidad oral (CCE-CO)

3.2. Objetivos específicos

- Conocer la frecuencia de HPV en cánceres de cavidad oral.
- Identificar los genotipos de HPV presentes en estas neoplasias.
- Correlacionar los datos virológicos con los datos epidemiológicos disponibles.

4. Hipótesis del trabajo

- La frecuencia de ADN de HPV en cánceres de cavidad oral en Argentina es similar a la hallada en otras partes del mundo.
- La distribución de genotipos de HPV-AR en estos tumores es semejante a la descrita en otras regiones geográficas, con predominio del HPV16, por ser el virus con mayor eficiencia para diseminarse, persistir e inducir una transformación maligna.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño del estudio, población y muestras

5.1.1 Comité de ética

El presente trabajo es parte del proyecto de investigación: “Estudio del rol del Virus del Papiloma Humano en lesiones premalignas y malignas de cabeza y cuello”, llevado a cabo en el Servicio Virus Oncogénicos en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Malbrán. Dicho proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en la Investigación del Instituto de Genética Médica de la ANLIS - Dr. Malbrán. (Anexo 1).

Este estudio no requiere el consentimiento informado de los pacientes debido a que es retrospectivo; comprende biopsias fijadas y embebidas en parafina que datan de varios años atrás. Por lo tanto, se realizó la disociación de datos de las mismas, suprimiendo todo tipo de identificación que pudiesen asociarse con los pacientes (muestras anónimas).

5.1.2 Diseño

Se planteó un estudio descriptivo transversal y retrospectivo sobre biopsias de CO de archivo con diagnóstico histológico correspondiente a CCE (cánceres de células escamosas).

5.1.3 Población y Muestras

Se estudiaron 208 muestras de biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, del inglés *formalin fixed paraffin embedded*) pertenecientes a pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 31 a 99 años (promedio de edad: 65,8), con diagnóstico histológico de CCE, de los últimos 10 años. Las muestras corresponden a las siguientes sublocalizaciones anatómicas dentro de la boca: lengua (N=77), encía (N=43), carrillo (N=24), piso de boca (N=15), paladar duro (N=12), trígono retromolar (N=10), mucosa labial (N=7), sin especificación de sublocalización (N=9) y otros (tumores que comprometen a más de una localización anatómica: la encía, lengua y piso de la boca) (N=11).

Estas muestras fueron provistas por los Servicios de Anatomía Patológica de:

- 1) Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires (CABA) (N=122)
- 2) Hospital de Oncología María Curie (CABA) (N=32)
- 3) Hospital José Ramón Vidal (provincia de Corrientes) (N=25)
- 4) Hospital de Clínicas José de San Martín (CABA) (N=23)
- 5) Centro de Patología Dr. Boris Elsner (CABA) (N=15)
- 6) Hospital Interzonal General de Agudos "Evita" (Provincia de Buenos Aires) (N=7)
- 7) Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú (CABA) (N=6)
- 8) Hospital Centenario (Provincia de Entre Ríos) (N=5)
- 9) Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas (Provincia de Buenos Aires) (N=1)
- 10) Hospital Interzonal General de Agudos "Profesor Dr. Luis Güemes" (Provincia de Buenos Aires) (N=1)

Selección de las muestras a analizar:

El proceso de selección de los tacos fue llevado a cabo por el responsable del Servicio de Anatomía Patológica de cada centro participante. Una vez corroborado el diagnóstico de los cortes histológicos, se procedió a la búsqueda y selección de los tacos en el archivo. Para todas las muestras se completó una ficha con los siguientes datos: sexo, edad al momento del diagnóstico y sublocalización anatómica de la lesión (Anexo 2).

Estos materiales fueron entregados al Servicio Virus Oncogénicos (INEI-ANLIS Dr. C. Malbrán), donde se procedió a realizar los cortes correspondientes y los estudios experimentales de biología molecular (Fig. 6).

Figura 6.

Tacos de las biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina.



5.2 Parte Experimental

5.2.1 Procedimiento para la realización de los cortes histológicos:

Se puso a punto un protocolo minucioso de cortes de tacos para el análisis del ADN y ARN viral, por métodos de biología molecular; y para el estudio de la proteína celular p16^{INK4a}, por técnicas de inmunohistoquímica. Este protocolo fue diseñado por el Instituto Alemán de Investigación sobre Cáncer (DKFZ, Heidelberg) (Smeets et al., 2007).

Para evitar la contaminación cruzada del material celular entre tacos de tejido consecutivos, se debieron tomar las siguientes precauciones durante el procedimiento:

- Usar guantes durante todo el procedimiento.
- Cambiar los guantes cuando se indique en el protocolo para evitar la contaminación cruzada.
- Usar una nueva cuchilla desechable para cada bloque de tejido.
- Mantener los tubos cerrados durante el procedimiento, excepto para la transferencia de tejido.
- Limpiar el equipo y las herramientas con acetona, etanol 70% y RNase AWAY (Sigma-Aldrich), utilizando toallitas húmedas para evitar la propagación de contaminaciones.
- Utilizar un bloque de control de contaminación (BCC), que contiene solo parafina (sin tejido), para controlar la contaminación cruzada, intercalando dicho bloque, cada 10 muestras durante el procedimiento.

Los cortes de los tacos fueron llevados a cabo por personal capacitado del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Curie y la tesista.

Brevemente, con cada uno de los tacos se procedió de la siguiente manera:

1. Se colocó el taco, previamente refrigerado, en el micrótopo para la realización de los cortes.
2. Se desgastó el taco de un espesor de 10-30 μm para exponer el tejido prolijamente (de acuerdo al tamaño del tejido) y se descartó el material recortado.
3. Posteriormente, se procedió a realizar los cortes, para el estudio, del ADN viral y el ARN viral y de la proteína celular p16^{INK4A} (Fig. 7). El número y grosor de las secciones/rulos de parafina, en base al área del tejido, se especifican en la tabla 3. Se recogieron los rulos de tejido con un escarbadietes nuevo y se las colocó en tubos tipo Eppendorff secos (libre de DNasa/RNasa), previamente rotulados. Dichos tubos se conservan a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Las láminas para p16^{INK4A} fueron montadas sobre portaobjetos pretratados (cargados positivamente) (Genex super carga plus +, Genex Diagnostic).

4. Se descartó la cuchilla; se retiró el bloque de tejido del soporte y se eliminó cualquier residuo de corte; se limpió minuciosamente el soporte de la cuchilla y el micrótopo con acetona y etanol, y luego se descartaron las toallitas húmedas.
5. Se repitió el procedimiento para cada uno de los tacos.

6. Una vez terminado el proceso se registró en una hoja de trabajo el nombre del operador, la fecha y en qué orden se seccionaron los tejidos (importante para rastrear una posible contaminación cruzada) (Anexo 3).

Figura 7.

Esquema que muestra el orden, número y grosor de las secciones a cortar.

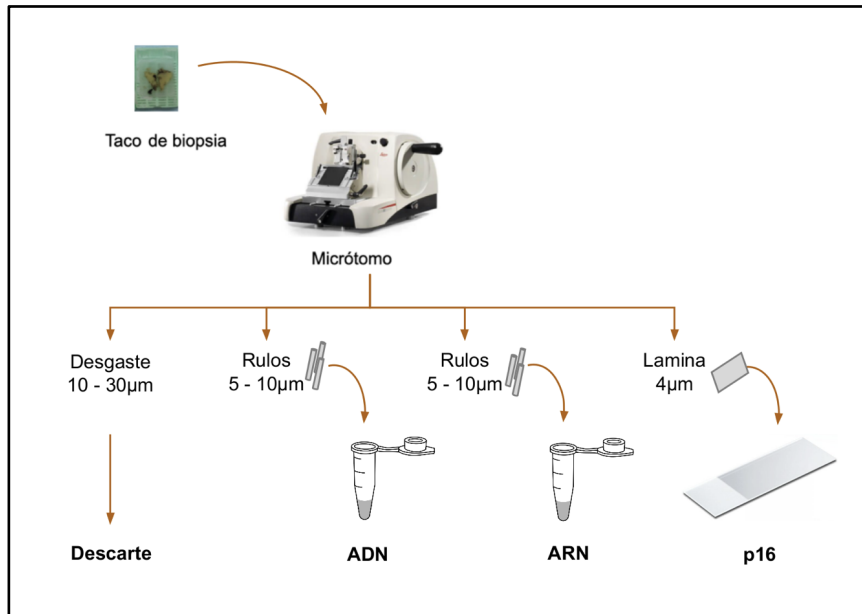


Tabla 3.

Especificaciones sobre la cantidad y el grosor de los cortes histológicos según el tamaño del tejido fijado y embebido en la parafina.

Área del tejido (cm)	Espesor de la sección	Rulos por tubo
>1,0x1,0	5 µm	1
>0,5x0,5, <1,0x1,0	5 µm	3
<0,5x0,5	10 µm	3

Nota. El número y el grosor de las secciones para el aislamiento de ADN / ARN dependen del tamaño del tumor y se describen mediante el algoritmo que muestra la tabla.

En esta tesis, se utilizó únicamente el tubo conteniendo los cortes de tejido (rulos) destinados a la investigación del ADN viral.

5.2.2 Desparafinización

Este proceso se llevó a cabo sin solventes, usando dos temperaturas diferentes: un tratamiento térmico a 120 °C y luego la digestión a 65 °C. Para llevarlo a cabo se utilizaron bloques térmicos Accublock Dry Bath (Labnet) (Fig.8) y el kit comercial QIAamp DNA MiniKit, (Catálogo 51326-QIAGEN), de acuerdo a lo descrito por el Laboratorio Global de Referencia de HPV, Centers for Disease Control and Prevention, CDC, EEUU (Steinau et al., 2011).

Brevemente, a cada uno de los tubos tipo Eppendorf conteniendo los rulos de tejido:

- 1) Se adicionó 180 µl de buffer ATL (provisto por el kit), se homogeneizó y se incubó en un bloque seco a 120 °C por 20 min. para disolver la parafina de la muestra.
- 2) Luego, se agregó 20 µl de Proteinasas K y se incubó a 65°C durante toda la noche en bloque seco sin agitación.

Figura 8.

Incubación de las muestras en bloques térmicos



Nota. La incubación se realizó a las dos temperaturas requeridas para desparafinizar (120°C y 65°C) según el protocolo.

5.2.3 Extracción y purificación del ADN

La purificación de ADN a partir de las muestras del tejido previamente desparafinizado, se realizó utilizando columnas del mismo equipo comercial QIAamp DNA MiniKit (Qiagen). Resumidamente el protocolo consistió en los siguientes pasos:

- 1) Se añadieron 200 µl de *buffer* AL (provisto por el kit) y 200 µl de etanol a cada tubo de muestra, y se homogeneizó, para la precipitación del ADN.
- 2) Se transfirió el Vf a las columnas (DNeasy Mini Spin column) para realizar la filtración. Se centrifugó para separar la solución a 8000 rpm por 1 min.
- 3) Se descartó la solución filtrada, la cual pasó por la membrana de la columna a un tubo colector.

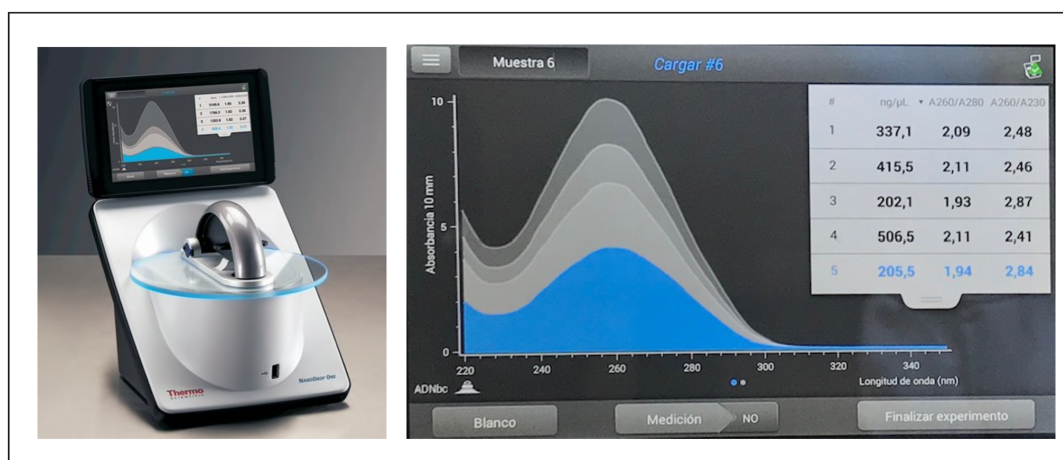
- 4) Se realizaron dos lavados del ADN donde los inhibidores de la PCR, como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminaron por completo. Primero se añadió el 1º buffer de lavado (500 µl), se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. y se descartó la solución que se encontraba en el nuevo tubo colector; luego se repitió el mismo proceso, pero con el 2º *buffer* de lavado (500 µl).
- 5) Finalmente se agregó 100 µl del buffer de elusión (Vf) para el almacenamiento del ADN puro hasta su uso.

5.2.4 Lectura del ADN obtenido

Una vez extraído y purificado el ADN, se procedió a realizar la lectura del ADN, con la finalidad de estimar la cantidad y pureza del mismo en el extracto. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro *NanoDrop One* (Thermo Scientific) (Fig. 9). El ADN extraído y purificado se almacenó en freezer a -20°C hasta su posterior uso.

Figura 9.

Cuantificación del ADN extraído y purificado de las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop One.



Nota. Adaptado del catálogo de Fisher Scientific (*Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*).

5.3 Métodos

5.3.1 Detección y genotipificación de HPV

La detección y genotipificación se llevó a cabo por PCR (siglas en inglés de “Reacción en Cadena de la Polimerasa”) combinada con Hibridación Reversa en línea (RLB, del inglés *Reverse Line Blotting*).

5.3.1.1 Detección de genotipos de HPV del género alfa, mediante el sistema de cebadores BSGP5+/6+Bio:

Se llevó a cabo mediante PCR, utilizando los cebadores consenso (BSGP5+/6+Bio) (Schmitt et al., 2008; van den Brule et al., 2002) (Anexo 4), que amplifican un fragmento de 140 pb de la región L1, de acuerdo al Manual de Procedimientos elaborado en el laboratorio del Servicio de Virus Oncogénicos (INEI-ANLIS Dr. Malbrán). Por ser esta región altamente conservada, permite detectar un amplio espectro de HPV, 36 genotipos distintos, que habitualmente infectan el tracto anogenital en una única reacción. Este sistema también incluye cebadores de β globina, utilizado como control interno de la reacción, produciendo un fragmento de 208 pb. En resumen se realizó el siguiente proceso:

- 1) La mezcla de reacción se realizó en un Volumen final (Vf) de 50 μ l conteniendo: 0,2 mM de cada dNTP; 4 pmol de cada uno de los cebadores BSGP5+/6+Bio; 3,5 mM de $MgCl_2$ y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa, (Thermo Fisher Scientific Inc. Catalogo 10342053). Se agregaron 5 μ l del ADN purificado. Debido a que los cebadores *reverse* de la β Globina y del pool GP6+ están biotinilados, los productos de PCR pueden ser tipificados por RLB, utilizando oligosondas tipo-específicas.
- 2) La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems). El programa de ciclado fue el siguiente: 94°C 4 min, seguidos de 40 ciclos, 94°C 20 seg, seguido de una rampa, de 5,39°C/seg hasta 38°C, 38°C por 30 seg, seguido de una rampa, 4,43°C/seg hasta 71°C, 71°C durante 80 seg y 71°C 4 min.
- 3) Como control positivo (CP) se usó ADN de las líneas celulares SiHa y HeLa (provenientes de CCU portadoras de HPV16 y HPV18 respectivamente) y como control negativo (CN) se utilizó ADN de una línea celular humana HPV negativa (C33A) y agua destilada.

5.3.1.2 Hibridación Reversa en Línea:

Para realizar la genotipificación viral, luego de la amplificación empleando el sistema anteriormente descrito, se llevó a cabo una hibridación reversa en línea. Esta estrategia usa oligosondas tipo-específicas permitiendo la identificación de 36 genotipos virales, pertenecientes a los géneros alfa (HPV genotipos: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89) (Anexo 5).

El procedimiento se llevó a cabo usando un aparato *minibloter* (Hoefer) (Fig. 10) e incluyó tres etapas: la preparación de la membrana, la reacción de hibridación y la detección de los híbridos formados. Cabe destacar que esta estrategia metodológica no comercial, ha sido validada por el servicio Virus Oncogénicos (INEI-ANLIS Dr. C. Malbrán) en el marco de su actividad como laboratorio Nacional de Referencia para HPV, siendo la eficiencia en su desempeño respaldada por la correcta resolución de los paneles de control de calidad internacionales, enviados anualmente por el laboratorio Global de Referencia de HPV (Suecia) (Eklund et al., 2018).

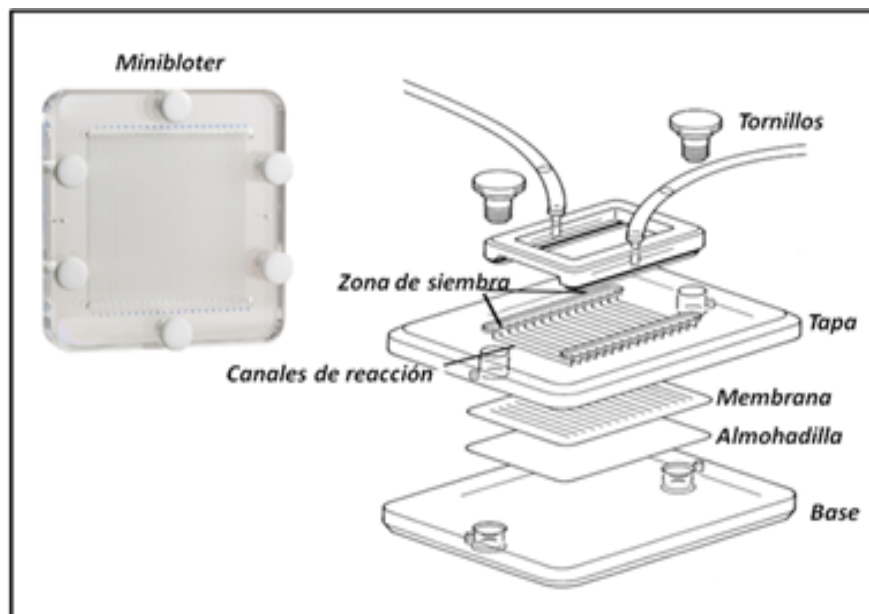
- 1) **Preparación de la membrana:** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento operativo estándar del Servicio Virus Oncogénicos del INEI –ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Primeramente, las oligosondas fueron sintetizadas incluyendo un grupo amino terminal en la posición 5', con el fin de poder ser fijadas covalentemente a una membrana de nylon, Biotinylated C (Life sciences, cat n° P/N 60336). Brevemente la preparación de la membrana comprende los siguientes pasos:

- a. La activación de la membrana fue mediante el tratamiento con una solución de EDAC 16% (Calbiochem, cat n°341006), a temperatura ambiente, durante 10 min.
- b. Se sembraron 140 μ l de cada una de las 36 oligosondas (20mM) en los canales paralelos del minibloter (Hoefer) y del control de quimioluminiscencia (2 μ M).
- c. Se removió el líquido residual mediante aspiración.
- d. Se incubó la membrana con 100 ml de NaOH 100 mM, a fin de hidrolizar los restos carboxilos remanentes de la membrana.
- e. Se realizó un lavado con una solución 2x SSPE - 0.1% SDS a 60°C durante 5 min y finalmente un lavado con 100 ml de EDTA 20 mM (pH=8) durante 15 min.
- f. Para el almacenamiento de la membrana a 4°C, se la colocó dentro de una bolsa plástica con cierre hermético, mojada con una solución de EDTA 20 mM (pH=8), para evitar la sequedad.

Figura 10.

Representación esquemática del minibloter y su armado.



2) Reacción de hibridación:

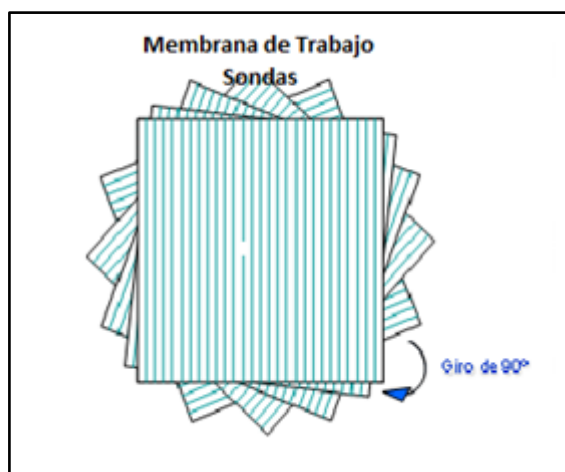
Los productos amplificados biotinilados fueron sembrados en los canales paralelos del miniblotter, colocando la membrana de manera tal que las muestras quedan en forma perpendicular a las líneas donde fueron previamente fijadas las oligosondas (Fig.11).

Brevemente, el procedimiento se llevó a cabo mediante las siguientes acciones:

- Se añadió 10 μ l de los productos amplificados biotinilados a 150 μ l de 2X SSPE - 0,1% SDS y desnaturalizó 10 min a 95°C.
- Se dispuso la membrana de *nylon* sobre una almohadilla (GE Healthcare Bio-Sciences cat n° 11-0035-21) en el *miniblotter*, de manera que las hendiduras del mismo queden perpendiculares a las líneas donde anteriormente fueron fijadas las oligosondas.
- Se removió el líquido residual mediante aspiración.
- Se cargaron los canales del *miniblotter* con 140 μ l del producto de PCR diluido, preparado anteriormente.
- Se incubó a 42°C durante 60 min en un horno de hibridación.
- Se removieron las muestras del *miniblotter* y lavar la membrana 2 veces con 100 ml de una solución 2x SSPE / 0.5 % SDS, a 52°C durante 10 min.

Figura 11.

Esquema para la aplicación de las muestras en la membrana de trabajo



3) Detección de los híbridos formados

Esta etapa incluyó tres pasos: la unión de los híbridos biotinilados con la enzima streptavidina marcada con peroxidasa, la reacción quimioluminiscente y el revelado fotográfico de la película.

En resumen, se realizaron las siguientes acciones:

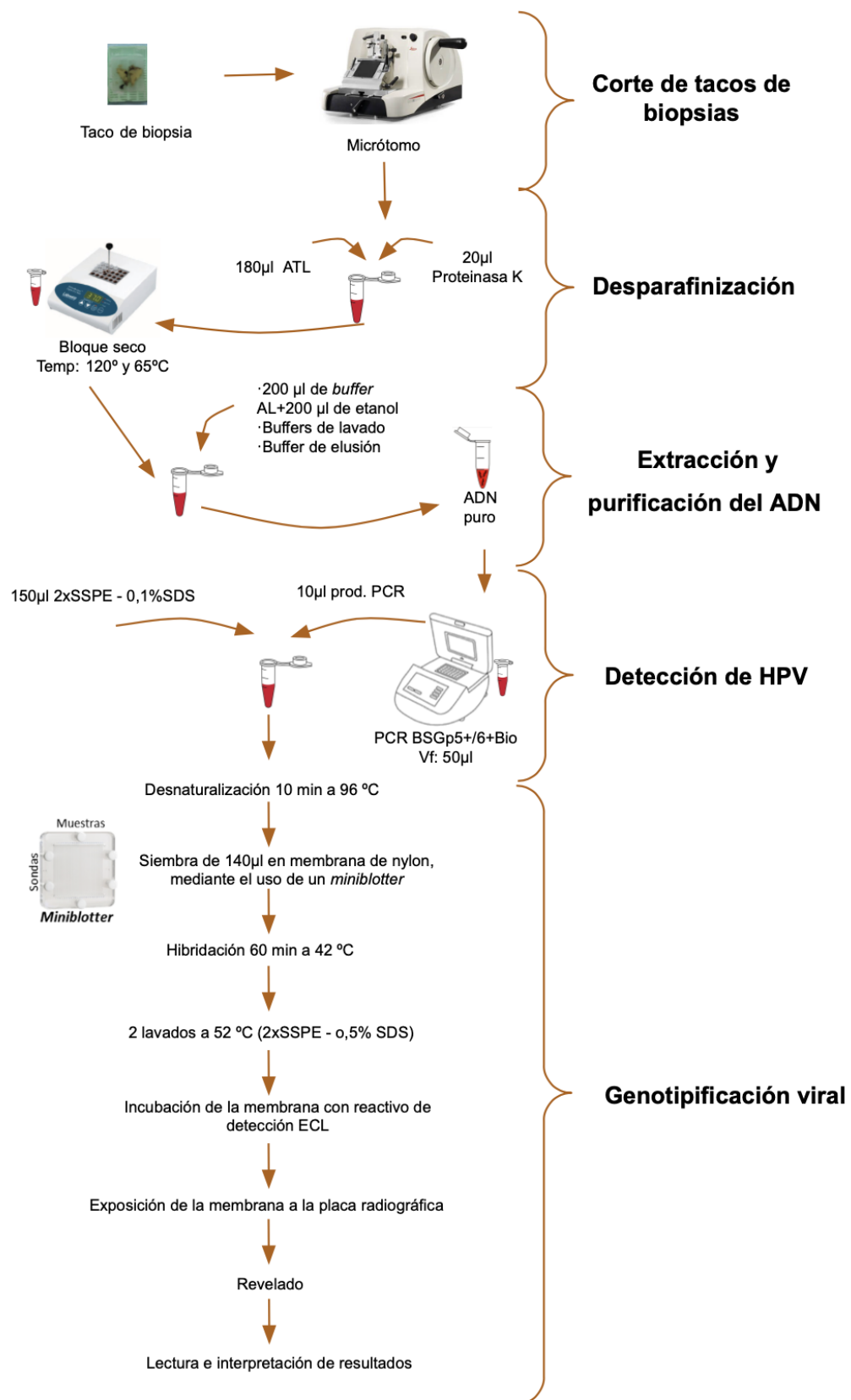
- a. Se incubó la membrana con una dilución 1:4000 del conjugado estreptavidina-peroxidasa (GE *Healthcare*, cat nº RPN 1231), en 20 ml de 2X SSPE - 0,5% SDS a 42°C durante 45 min en el horno de hibridación STRATAGENE en una botella en rotación.
- b. Se realizó un lavado de la membrana 2 veces con 150 ml de 2X SSPE - 0,5% SDS a 42°C durante 10 min en el baño de agua BELLCO.
- c. Luego lavó la membrana 2 veces con 150 ml de 2X SSPE a temperatura ambiente 5 min.
- d. Se incubó la membrana con el reactivo de detección ECL™ (GE-*Healthcare*, cat nº RPN3004).
- e. Se expuso a la membrana (entre dos hojas de acetato transparente), a la placa radiográfica (GE *Healthcare* cat nº 28906836), durante toda la noche, dentro de una casete de radioautografía.
- f. Finalmente se reveló la placa radiográfica en un cuarto oscuro empleando el revelador (AGFA G150) y posteriormente el fijador (AGFA G334).

El proceso completo se resume en la Fig.12.

Debido a que estas membranas son reutilizables, una vez terminada la reacción de detección, se procedió a la regeneración de la membrana, que incluye la deshibridación del híbrido previamente generado. Este tipo de membrana puede ser usada como mínimo 10 veces. Este tratamiento se llevó a cabo mediante 2 lavados de 30 minutos con una solución de SDS 1% a 80°C y 1 lavado de 15 min con EDTA 20 mM (pH=8). Las membranas se guardaron a 4°C en una solución EDTA 20 mM (pH=8) hasta su nuevo uso.

Figura 12.

Esquema de las etapas de la detección y genotipificación viral.



5.3.1.3. Amplificación de beta globina humana:

En las muestras en las que no se detectó el DNA de HPV ni de beta globina por PCR-RLB, para confirmar la integridad del ADN purificado de las muestras, se realizó la amplificación de beta globina humana mediante PCR de punto final, usando los cebadores PCO3/KM38 (Anexo 6), que producen un fragmento de 158 pb (Saiki et al., 1988). La mezcla de reacción se realizó en un Vf de 10 ul, conteniendo: 0,2 mM de cada dNTP; 0,1 mM de cada uno de los cebadores PCO3 / KM38; 4,0 de MgCl₂ y 0,025 U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas). Se agregaron 5 µl de muestra conteniendo el ADN blanco y el perfil térmico utilizado fue el siguiente: 95°C 2 min, seguidos de 45 ciclos, 94°C 20 seg, 55°C 20 seg, 72°C 20 seg y 72°C 5 min. Como CP, se usó ADN genómico humano (Roche, cat nº 11691112001) y como CN, H₂O destilada.

El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y corridos en *buffer* Tris Borato EDTA (TBE). Como marcador de peso molecular se usó el ADN escalera de 100 pb (Thermo Scietific Lot 00100477). El gel fue teñido con GelRed *Nucleic Acid Stain* (Biotium cat 41003), visualizado y fotografiado para registro, en un equipo transiluminador de UV.

5.4. Análisis estadístico

Para los cálculos estadísticos se usó el paquete SPSS 17 (Chicago, Illinois). La asociación entre variables categóricas se estudió con el test de chi-cuadrado y la asociación entre variables numéricas se estudió con test t. Se consideraron como estadísticamente significativos valores de p menores de 0,05.

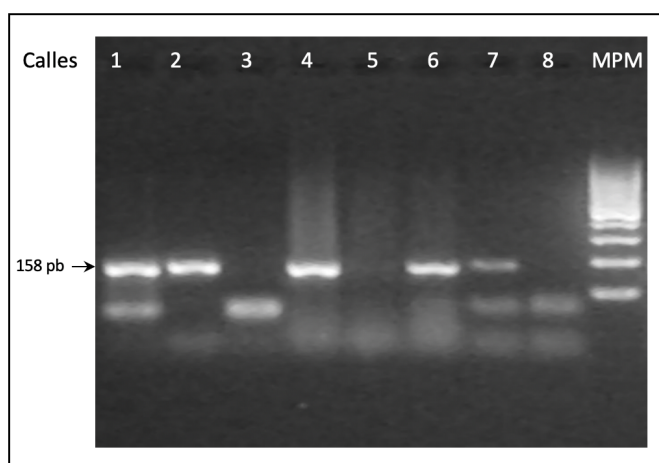
6. Resultados

El 88% (183/208) de muestras de tacos fijados en formol y embebidos en parafina resultaron aptas para el estudio (positivas para el gen de la beta globina humana). La Fig. 13 permite la visualización de los productos amplificados del gen de beta globina (158 pb) en gel de agarosa al 2%, que resultaron de la PCR (beta globina humana).

Veinticinco de las muestras recolectadas, resultaron no aptas para su análisis, esto significa que no se detectó ningún genotipo de HPV por PCR-RLB, ni el gen de beta globina humana por ninguno de los 2 métodos empleados (PCR-RLB y PCR de punto final).

Figura 13.

Foto de la corrida electroforética en gel de agarosa de los productos amplificados

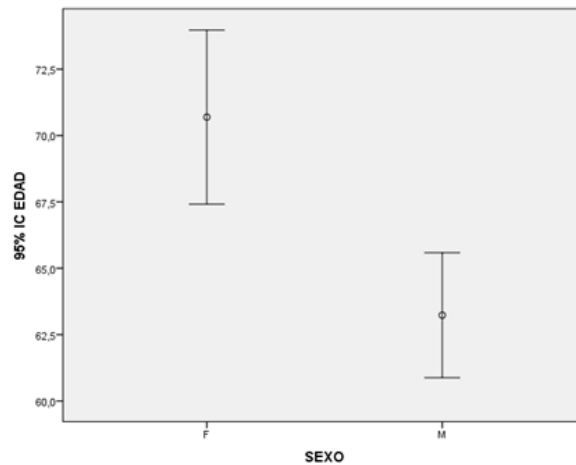


Nota. Análisis de los productos de PCR en electroforesis de gel de agarosa al 2%. MPM: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Calles 1, 2, 4, 5, 6: muestras positivas para el gen de la beta globina humana (158 pb). Calles 3: muestras en las que no se detectó el gen de la beta globina humana. Calle 7: control positivo (ADN genómico humano) Calle 8: control negativo (H₂O).

El 60% de las muestras correspondieron a hombres y el 40% a mujeres; se observó que la edad media de las mujeres con cáncer de CO fue mayor que la de los hombres [(diferencia 7,46; 95% Intervalo de confianza (95%IC) 3,54-11,38] (Fig. 14).

Figura 14.

Análisis de la asociación de la edad y el sexo en la población estudiada.



Nota. F: Femenino. M: Masculino

Genotipificación de HPV

La identificación de los genotipos de HPV, tanto en infecciones simples como múltiples, se realizó mediante PCR seguida de hibridación reversa en línea.

La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante una grilla ya establecida para tal fin, siguiendo los siguientes pasos:

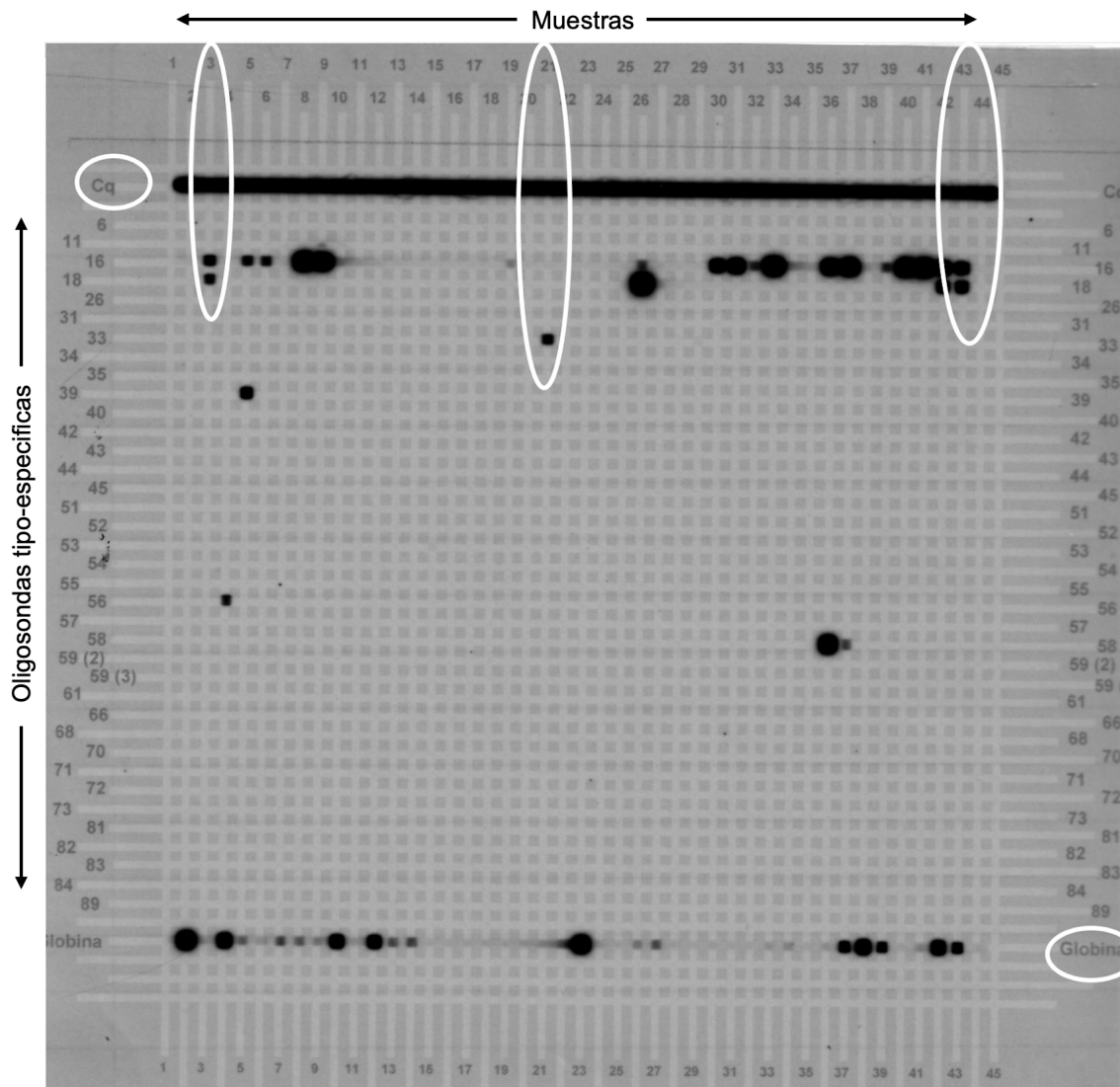
- Centrar la placa radiográfica revelada, sobre la grilla de lectura, utilizando los controles positivos (HPV16 y 18) y de quimioluminiscencia (se observa como una línea negra continua horizontal).

- Comenzar la interpretación de los resultados, cruzando el tipo viral ubicado a la derecha e izquierda de la grilla, con el canal de la muestra, ubicado en la parte superior e inferior de la grilla.

La presencia en la película radioautográfica de una mancha oscura a la altura de uno (infección simple) o varios genotipos virales (infección múltiple), indica su presencia en la muestra ubicada en ese canal. La Fig. 15 muestra una imagen de la película de la membrana hibridada montada sobre una grilla de lectura, correspondientes a la genotipificación de las muestras incluidas en el proyecto de investigación “Estudio del rol del Virus del Papiloma Humano (HPV) en lesiones premalignas y malignas de cabeza y cuello”

Figura 15.

Foto de una película con los resultados de la genotipificación de HPV mediante hibridación reversa con oligosondas biotiniladas.



Nota: Foto obtenida luego del revelado por quimioluminiscencia al final de la hibridación reversa. La positividad se observa como manchas grises a negras. A modo de ejemplo, en la Calle 3: HPV16,18 (infección múltiple); Calle 21: HPV33 (infección simple); Calle 43: CP (HPV16/18); Calle 44 CN (Control Negativo PCR). En la primera línea, control de quimioluminiscencia (Cq) y en la última el control de integridad del ADN (Globina).

El DNA de HPV fue detectado en el 9,83 % (18/183).

No se observaron diferencias en la positividad de HPV en los diferentes centros que aportaron muestras ($p=0,413$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron la presencia viral y el sexo ($p=0,261$) o la edad ($p=0,948$) (tabla 4).

Tabla 4.

Distribución de las muestras HPV positivas y HPV negativas de acuerdo al sexo y la edad.

	HPV positivas N (%)	HPV negativas N (%)
Género		
Femenino N=73	5 (6,8)	68 (93,2)
Masculino N=109	13 (11,9)	96 (88,1)
s/d* N=1	0	1 (100,0)
TOTAL N=183	18 (9,8)	165 (90,2)
Edad		
de 31 a 50 N=17	3 (17,6)	14 (82,4)
de 51 a 70 N=87	9 (10,3)	78 (89,7)
de 71 a 99 N=57	5 (8,8)	52 (91,2)
s/d* N=22	1 (4,5)	21 (95,5)
TOTAL N=183	18 (9,8)	165 (90,2)

*Sin datos de localización.

La distribución de las muestras HPV positivas y HPV negativas de acuerdo con la sublocalización anatómica dentro de la cavidad oral, se muestra en la tabla 5.

Tabla 5.

Distribución de las muestras HPV positivas y HPV negativas de acuerdo con la sublocalización anatómica.

Sitio del tumor	HPV positivas	HPV negativas
	N (%)	N (%)
Lengua N=65	7 (10,7)	58 (89,2)
Encía N=39	4 (10,3)	35 (89,7)
Carrillo N=19	0	19 (100,0%)
Piso de boca N=15	1 (6,7%)	14 (93,3%)
Paladar N=12	2 (16,7%)	10 (83,3%)
Otro* N=10	1 (10,0%)	9 (90,0%)
Trígono retromolar N=9	2 (22,2%)	7 (77,8%)
Mucosa labial N=7	0	7 (100,0%)
s/d** N=7	1 (14,3%)	6 (85,7%)
TOTAL	18 (9,8%)	165 (90,2%)

*Tumor que compromete varias localizaciones, abarcando encía, lengua y piso de boca.

**Sin datos de localización.

Se identificaron un total de 12 genotipos que incluyen tanto HPV-AR y HPV-BR; la Fig.16a muestra el espectro de genotipos identificados; el HPV 16 con el 33,3% (6/18) fue el genotipo más frecuente. La Fig.16b muestra cómo fue la distribución de los genotipos en las diferentes sublocalizaciones dentro de la cavidad oral.

El 94,4 % (17/18) de las infecciones corresponden a infecciones simples, identificándose HPV-AR en el 88,2 % de ellas (15/17); una sola muestra (1/18), correspondió a una infección múltiple con cuatro HPV-AR (HPV45, 52, 58, 59).

Figura 16.

Distribución de genotipos de HPV.

a. En los cánceres CO

b. En las sublocalizaciones dentro de la cavidad oral.

Figura 16a

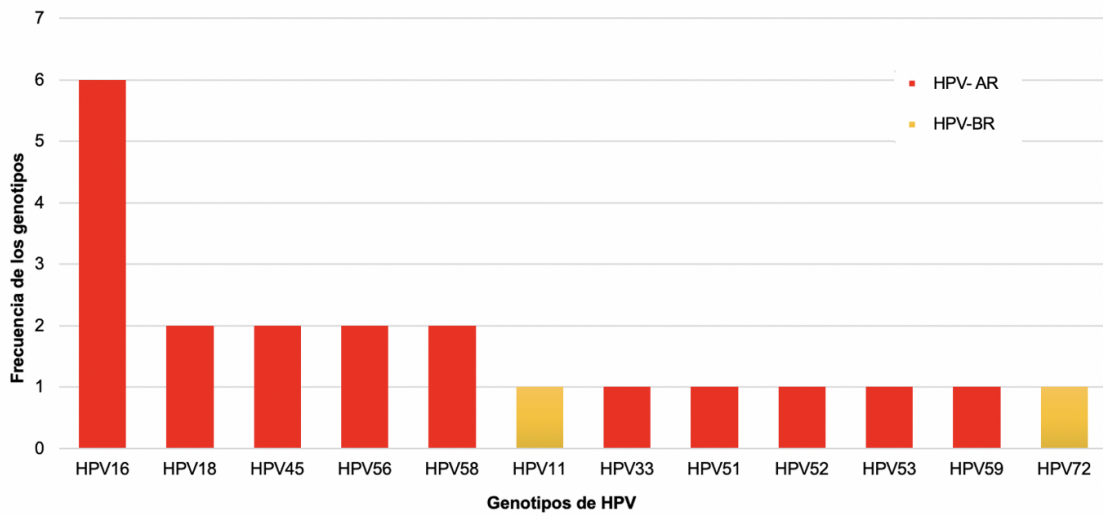
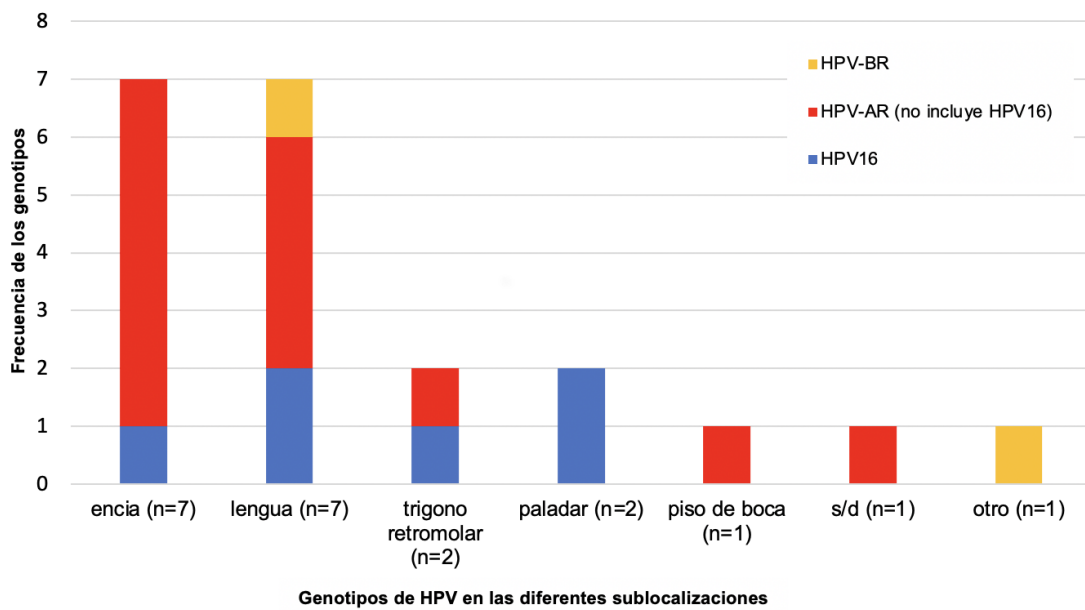


Figura 16b



7. Discusión

La incidencia de los cánceres localizados fuera del tracto anogenital es el 12% del total de cánceres asociados al HPV, siendo el 2% correspondiente a los CCE-CO (de Martel et al., 2020).

Dentro de cabeza y cuello, las neoplasias de CO y orofaringe históricamente se agrupaban bajo el término general "oral" o "cáncer oral" debido a que estas dos localizaciones forman un compartimiento continuo revestido por un epitelio escamoso estratificado ininterrumpido; actualmente se sabe que son diferentes en muchos aspectos importantes, y esta distinción ha sido evaluada por expertos y reconocida en la séptima edición del manual de estadificación de cáncer de Estados Unidos (AJCC) (del inglés *American Joint Cancer Committee*) (Lee et al., 2005; Yete et al., 2017; Westra and Lewis., 2017). Examinar y diferenciar cada uno de los sitios y subsitios anatómicos de la cabeza y el cuello, es necesario para interpretar correctamente los datos epidemiológicos publicados, ya que los tumores en las diferentes localizaciones presentan pronósticos diversos y podrían estar asociados con diferentes factores de riesgo. Los CCE-CO, son neoplasias con una alta tasa de mortalidad, el 85% de ellas se detecta en etapas avanzadas; y en cuanto a los factores de riesgo, además del consumo de tabaco y alcohol, también se destacan otros como, la ingesta de bebidas y comidas muy calientes, el trauma crónico sobre algún sector de la mucosa producido por dientes o prótesis en mal estado, la falta de higiene de la boca y la presencia de HPV16 y 18 (Gillison et al., 2000; Hübbers & Akgül, 2015; Lafaurie et al., 2018).

En este estudio, la presencia de ADN de HPV en la cavidad oral se investigó en FFPE; estas muestras, constituyen especímenes muy valiosos ya que permiten acceder a material de archivo para trabajos retrospectivos. Dada la necesidad de evitar cualquier tipo de contaminación cruzada durante el procesamiento de los tacos y la importancia de contar con un método que garantice la remoción adecuada de la parafina e inhibidores de PCR, y la obtención de ADN a partir de la digestión de tejidos, se puso a punto en el servicio Virus Oncogénicos un protocolo para la obtención de los cortes histológicos (rulos) a partir de los tacos de parafina almacenados en los laboratorios de Anatomía Patológica de los centros participantes. La implementación de este protocolo permitió contar con un buen material de partida para el estudio de los ácidos nucleicos virales; sólo un 12% de las muestras obtenidas de los tacos no fueron aptos para el análisis molecular (beta globina negativos). Esto podría haberse debido, entre otras cosas a que las muestras hayan sido afectadas por el tipo de fijador utilizado y/o los tiempos de fijación empleados durante su procesamiento en los centros donde se realizó el diagnóstico histopatológico; aunque no se podría descartar un problema intrínseco de las muestras, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la aptitud de las mismas en los diferentes centro que las proveyeron.

A fin de detectar en forma rápida, sensible y específica un amplio espectro de genotipos de HPV que infectan las mucosas, en el presente trabajo se usaron sistemas que combinan PCR con hibridaciones empleando un conjunto de 36 oligosondas tipo-específicas, correspondientes a los géneros alfa, en una única reacción (PCR-RLB). Debido a que el tamaño de los productos amplificados es relativamente pequeño (150 pb), la PCR alcanza un muy buen desempeño, tanto en materiales frescos (células y tejidos) como FFPE; en consecuencia, la técnica resulta muy adecuada para estudios de investigación epidemiológica, permitiendo realizar análisis retrospectivos en muestras de archivo, como es el caso de este trabajo de tesis (van den Brule et al., 2002; Schmitt et al., 2008).

En Argentina todavía es escasa la información acerca de la participación etiológica del HPV en los CCE-CC; por este motivo y estimulados en parte por el crecimiento del tema a nivel mundial, así como del interés de la comunidad médica de nuestro país, en el año 2017 se formó el *Consortio Argentino para el Estudio de HPV en Cánceres de Cabeza y Cuello*, coordinado por el Servicio Virus Oncogénicos. Este grupo está constituido por profesionales de diversas disciplinas pertenecientes a instituciones de gran prestigio de nuestro país; su objetivo fue proveer muestras para recabar datos locales de manera de incrementar el conocimiento en este tema y así, comprender mejor el rol del virus identificado en estos tumores.

Las prevalencias de HPV encontradas en CCE-CO muestran discrepancias en las diferentes regiones geográficas. La frecuencia hallada en nuestro estudio (9,8%) es intermedia a la informada en América del Norte y Europa (13,4% y 17,5%, respectivamente) y a la encontrada en Brasil (3,3%), país muy cercano geográficamente al nuestro (Abreu et al., 2018), pero bastante menor a la de América Central y del Sur (33,1%) (Ndiaye et al., 2014).

Estudios previos en Argentina han encontrado una frecuencia mayor, 43,7% (Gonzalez et al., 2007) y 42% (Criscuolo et al., 2020); Las diferencias podrían deberse a los distintos tipos de muestras analizadas (biopsias, lavados bucales, hisopados, FFPE), la diferente sensibilidad de los métodos aplicados, la cantidad de muestras incluidas, entre otros. Estas diferencias podrían también explicarse por la existencia de un subconjunto de CCE-CO asociado etiológicamente al HPV. Estudios con mayor número de muestras podrían esclarecer el rol de esta infección por HPV en esta localización anatómica.

La frecuencia de HPV-AR en CCE-CO informada en diferentes estudios, muestra también gran variabilidad, observándose frecuencias entre 23,5 - 85% (Ang et al., 2010; Gillison et al., 2000; Anantharaman et al., 2017); independientemente de las diferencias porcentuales informadas, el HPV16 es el genotipo más detectado (Anantharaman et al., 2017; Furrer et al., 2006; Gonzalez 2007; Criscuolo et al., 2020; Ndiaye et al., 2014). Nuestros resultados están en concordancia con esto último, observándose una frecuencia para HPV16 de 33,3%. Este resultado corrobora la ventaja selectiva de este genotipo para replicarse, mantenerse activo y transmitirse, lo que explica en gran parte su alta prevalencia a nivel mundial (Khan et al., 2005; Schiffman et al., 2011).

Con relación al género de los pacientes incluidos en nuestro estudio, las muestras de CCE-CO fueron más frecuentes en el género masculino (60%) que en el género femenino (40%), aunque sin diferencias significativas. Una observación interesante fue que la edad media de las mujeres en la fecha del diagnóstico de CCE-CO fue mayor que la de los hombres. Estos resultados están en línea con un artículo publicado recientemente por Li et al, que reporta estas neoplasias en mujeres de mayor edad y con diagnósticos menos severos que hombres; los autores argumentan que esto podría deberse a que las mujeres acuden más frecuentemente a las consultas y/o controles con profesionales sanitarios lo cual lleva también a un diagnóstico de la neoplasia en estadios más tempranos (Li et al., 2018).

En particular, los CCE-CO HPV positivos, se observaron con mayor frecuencia en hombres (11,9%) con respecto a mujeres (6,8%), aunque sin significancia estadística, semejante a lo reportado por otros investigadores (D'Souza et al, 2012; Gillison et al., 2012; de Martel et al., 2017); si bien esto podría estar relacionado a que los hombres serían más propensos a tener un mayor número de parejas y a las prácticas de sexo oral sin protección (D'Souza et al, 2012), nuestro estudio no nos permite confirmarlo ya que una limitación del mismo, es no contar con datos epidemiológicos acerca de los diferentes factores de riesgo (conducta sexual, tabaquismo y alcoholismo).

La relación entre la edad de los individuos con CCE-CO y la positividad para HPV ha sido evaluada por diferentes autores, vinculándose con preferencia a personas más jóvenes, entre los 50-65 años (D'Souza et al., 2009, Gillison et al., 2000). En este trabajo no se ha encontrado esta asociación; sin embargo es importante destacar que el N en cada rango etario analizado fue muy bajo, por lo cual sería necesario ampliar el estudio, para consolidar estos resultados.

En esta investigación se evidenciaron mayoritariamente infecciones simples, o sea causados por único tipo viral (17/18), en general involucrando HPV-AR; similar a lo referido por otros autores (Anantharaman et al., 2017; Hübbers & Akgül, 2015; Lingen et al., 2013). Esto se asemeja a lo descrito para la carcinogénesis inducida por HPV en CCU, en la cual, dado el origen monoclonal, a medida que aumenta la gravedad de las lesiones disminuyen las coinfecciones; en el cuello de útero se ha demostrado por microdissección que cada lesión es producida por un solo tipo viral. (van der Marel y col., 2015). En las muestras analizadas sólo dos casos contenían HPV-BR (HPV11 y HPV72), los cuales también han sido previamente reportados en otros trabajos en cánceres orales (Miller & White, 1996; Gonzalez et al., 2007) y en cánceres derivados de papilomas laríngeos (Joen et al., 2009). Aunque se trata de casos extremadamente infrecuentes, no se puede dejar de tener en cuenta que forman parte de una familia de virus con potencial oncogénico; sería interesante evaluar otros marcadores adicionales que ayuden a esclarecer la posible asociación etiológica de estos virus en la carcinogénesis de CCE-CO.

En relación con las sublocalizaciones en la CO, la lengua está cobrando, cada vez más preponderancia; en el presente estudio fue la localización con mayor frecuencia de HPV detectada 38,8%, en concordancia con lo reportado por otros investigadores (29-50%) (Yete et al., 2017; Duncan et al., 2013). Estas neoplasias estuvieron fuertemente vinculadas al consumo de alcohol y tabaco como principal factor de riesgo; sin embargo, más recientemente ha ido cobrando mayor fuerza la asociación de la infección por HPV-AR (en especial HPV16) con el desarrollo de estos tumores (Barwad et al., 2011; Tota et al., 2017).

La segunda sublocalización más frecuente fue la encía; la frecuencia de HPV hallada en este trabajo fue de 22,2%, porcentaje mayor al encontrado por Tota et al. (6,1%) (Tota et al., 2017), diferencia probablemente debida, en parte, al limitado número de casos en esta sublocalización de la boca. En la gingiva (parte de la encía), se presenta una situación particular; de la misma forma en que el virus infecta a las células basales en el tracto genital, existe evidencia de que el HPV también lo hace en el tejido gingival (Hormia et al., 2005). La gingivitis es una enfermedad periodontal que ocurre como consecuencia de mala higiene y procesos inflamatorios crónicos. La inflamación continua de las encías puede causar periodontitis, que hace que eventualmente se formen bolsas periodontales entre las encías y los dientes que es la única ubicación de la mucosa gingival donde las células basales están expuestas al medio ambiente. Un estudio de casos y controles mostró una asociación fuerte entre la periodontitis y la CCE-CO (Tezal et al., 2009, 2012). Esto llevó a la interesante hipótesis de que la inflamación crónica y la proliferación epitelial continua en la encía de unión podrían favorecer la replicación del HPV y constituirse en un reservorio importante para el HPV en la mucosa oral (Hübbers & Akgül, 2015).

Respecto a las otras sublocalizaciones dentro de la CO estudiadas en este trabajo, las frecuencias de HPV fueron más bajas que las dos anteriormente mencionadas (en trígono retromolar 11,1%, (2/18), en paladar 11,1%, (2/18) y en piso de boca 5,5% (1/18), similar a lo descrito por otros investigadores (Yete et al., 2017; Paz et al., 1997). Existen muy pocos trabajos que enfocan el estudio en los diferentes sitios anatómicos dentro de la boca; los datos del presente estudio contribuyen a profundizar el conocimiento en este tema.

La vacunación contra HPV es la principal estrategia de prevención primaria del CCU. Actualmente existen tres vacunas licenciadas: la vacuna Bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), dirigida a los HPV-AR tipos 16 y 18; la vacuna Tetravalente (Gardasil®; Merck & Co., USA / Sanofi Pasteur MSD, France), que está dirigida a los dos genotipos HPV-AR mencionados y a dos HPV-BR (HPV6 y HPV11) y la vacuna Nonavalente (Gardasil® 9, Merck & Co.) que contiene los cuatro genotipos incluidos en la vacuna tetravalente, más los HPV-AR tipos 31, 33, 45, 52 y 58. En Argentina, en el año 2011 se incorporó al Programa Nacional de Vacunación, con carácter gratuito y obligatorio, la inmunización con la vacuna contra HPV a las niñas de once (11) años de edad, con la vacuna bivalente; en el 2014, se cambió por la cuadrivalente y se incorporó a los individuos inmunodeprimidos y a partir del 2017, se amplió la vacunación a niños de once (11) años de edad.

De comprobarse el rol viral en estas neoplasias, la introducción de estas vacunas profilácticas serían alternativas potenciales para prevenir la transmisión de la infección en esta localización anatómica y así disminuir la incidencia de esta patología y la posible progresión a la malignidad (Gillison et al., 2012). Por otro lado, otra de las acciones primordiales en la prevención de estas neoplasias, es la concientización a la población y en este sentido, es fundamental, el compromiso de los docentes, médicos y odontólogos, especialmente los estomatólogos para darle visibilidad a esta patología y promover los controles periódicos.

En resumen, en este trabajo de tesis se llevó a cabo un exhaustivo trabajo de implementación de un protocolo para el procesamiento adecuado de muestras tejido de CCE-CO, fijado y embebido en parafina, para su uso en técnicas de biología molecular; asimismo ha generado uno de los reportes locales más extensos, proporcionando valiosa información sobre la frecuencia genérica y genotipo-específica de HPV en CCE-CO y corroborando el predominio de HPV16.

8. Conclusiones

Los principales logros de este trabajo de tesis son:

- La implementación de un protocolo para el procesamiento de las biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina archivadas en los servicios de Anatomía Patológica, permitió partir de un material de calidad para el estudio de los ácidos nucleicos virales.
- La genotipificación de HPV mediante PCR-RLB reafirmó un muy buen desempeño para muestras de biopsia (tacos); por lo tanto, se trata de una estrategia de elección para estudios epidemiológicos con material de archivo, como es el caso de este estudio.
- La obtención de información valiosa sobre la frecuencia y la distribución de genotipos de HPV en CCE-CO en nuestro medio, sumando evidencia sobre el predominio del HPV16. En caso de confirmarse la contribución del HPV a la carcinogénesis de estas neoplasias, podrían ser prevenidas por las vacunas actualmente en uso.
- La formación del *Consortio Argentino para el Estudio de HPV en Cánceres de Cabeza y Cuello*, permitió el acceso a una adecuada cantidad de muestras y demostró la riqueza de un trabajo multidisciplinario realizado mediante la interacción entre especialistas de distintas áreas de la biomedicina, principalmente odontólogos, patólogos y virólogos.

Perspectivas futuras:

- El biobanco de muestras generado a partir de la conformación del *Consortio Argentino*, permitirá futuras investigaciones de patogenia y variabilidad genética viral, como así también diversos biomarcadores genómicos de posible utilidad clínica.
- Dado que la sola presencia de ADN de HPV no es suficiente para establecer una relación causal con estas neoplasias, es importante explorar patrones de expresión viral y celular asociados a la carcinogénesis inducida por HPV, como ser la presencia de RNA viral o la expresión de la proteína celular p16^{INK4a}; esto permitirá entender mejor los mecanismos biológicos, en especial los oncogénicos de los virus identificados en estos tumores.

9. Bibliografía

- Abramson, A. L. (1989). Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surgery*, 115, 621-625. <https://doi.org/10.1001/archotol.1989.01860290079018>
- Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Beachler, D. C., Gheit, T., Olshan, A. F., Wisniewski, K., Wunsch-Filho, V., Toporcov, T. N., Tajara, E. H., Levi, J. E., Moyses, R. A., Bocci, S., Cadoni, G., Rindi, G., Ahrens, W., Merletti, F., Conway, D.I., Wrigth, S., Carreira, C., ... D'Souza, G. (2017). Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 140(9), 968-1975. <https://doi.org/10.1002/ijc.30608>
- Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D.I., Nguyen-Tân, P.F., Westra, W.H., Chung, C.H., Jordan, R.C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C.C., Redmond, K.P., & Gillison, M.L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*, 363(1), 24-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
- Barwad, A., Sood, S., Gupta, N., Rajwanshi, A., Panda, N., & Srinivasa, R. (2011). Human papillomavirus associated head and neck cancer: A PCR based study. *Diagnostic Cytopathology*, 40(10), 893–897. <https://doi.org/10.1002/dc.21667>
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., Van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, d. V. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*, 401(1), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
- Bernard, H.U., Chan, S.Y., & Delius, H. (1994). Evolution of Papillomaviruses. *CT Microbiology*, 186, 33-54. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78487-3_3
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A.R., San Jose, S., & Bruni, L. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 26(10), K1-K16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.064>
- Bosch, F.X., Muñoz, A., Meijer, C.J.L.M., & Shah, K.V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55, 244-265. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Burd, E. M. (2016). Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*, 29(2), 291-319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-15>.
- Candotto, V., Lauritano, D., Nardone, M., Baggi, L., Arcuri, C., Gatto, R., Gaudio, R.M., Spadari, F., & Carinci, F. (2017). HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral & Implantology*, 10(3), 209–220. <https://doi.org/10.11138/orl/2017.10.3.209>
- Castellsagué, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quiros, B., Tous, S., Clavero, O., Alós, L., Biegner, T., Szafarowski, T., Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Cleros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., & ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>
- Castle, P. E., Wheeler, C. M., Wentzensen, N., & Gravitt, P.E. (2010, Jan). Impact of Improved Classification on the Association of Human Papillomavirus With Cervical Precancer. *American Journal of Epidemiology*, 171(2), 155-163. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp390>
- CDC. (2020, Nov). *Cancers Caused by HPV*. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved Feb. 10, 2020, from <https://www.cdc.gov/hpv/parents/cancer.html>
- Chaturvedi, A.K., Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., Hernandez, B.Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M.T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C.F., Wentzensen, N., Jordan, R.C., Altekruze, S., & Anderson, W.F. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(32), 4294-4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
- Christensen, N.D. (2016). HPV disease transmission protection and control. *Microbial cell*, 3(9). 10.15698/mic2016.09.530
- Chung, C. H., Bagheri, A., & D'Souza, G. (2014). Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncology*, 50(5), 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.003>
- Criscuolo, M.A., Morelato, R.A., Belardinelli, P.A., Belardinelli, J., Cuffini, C., & Lopez de Blanc, S. (2020). Oral Human Papillomavirus: a multisite infection. *Oral Medicine and Pathology*, 25(3). <http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.23462>

- Dayyani, F., Etzel, C.J., Liu, M., Ho, C., Lippman, S. M., & Tsao, A. S. (2010). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology*, 2(15). <https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-15>
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G.M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global Health*, 8(2), e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
- de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International journal of cancer*, 141(4), 664-670. <https://doi.org/10.1002/ijc.30716>
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease markers*, 23(4), 297-313. <https://doi.org/10.1155/2007/613150>
- D'Souza, G., Agrawal, Y., Halpern, J., Bodison, S., & Gillison, M.L. (2009). Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of infectious diseases*, 199(9), 1263–1269. <https://doi.org/10.1086/597755>
- Duncan, L.D., Winkler, M., Carlson, E.R., Heidel, R.E., Kang, E., & Wedd, D. (2013). p16 Immunohistochemistry Can Be Used to Detect Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 71(8), 1367-1375. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.02.019>
- Durst, M., Gissmann, L., & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3812–3815. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3812>
- Fakhry, C., Westra, W.H., Wang, S.J., van Zante, A., Zhang, Y., Rettig, E., Yin, L.X., Ryan, W.R., Ha, P.K., Wentz, A., Koch, W., Richmon, J.D., Eisele, D.W., & D'Souza, G. (2017). The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*, 123(9), 1566–1575. <https://doi.org/10.1002/cncr.30353>

- Faraji, F., Zaidi, M., Fakhry, C., & Gaykalova, D. A. (2017). Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microbes and Infection*, 9(9-10), 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.06.001>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Piñeros, D.M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fields, B., Knipe, D. M., Howley, P. M., & Griffin, D. E. (2007). *Fields virology* (5^o ed.). Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins: USA.
- Franceschi, S., Bidoli, E., Herrero, R., & Muñoz, N. (2000). Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral oncology*, 36(1), 106-115. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(99)00070-6)
- Gillison, M.L., Broutian, T., Pickard, R.K., Tong, Z.Y., Xiao, W., Kahle, L., Graubard, B.I., & Chaturvedi, A.K. (2012). Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *Broutia*, 307(7), 693-703. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.101>
- Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Symer, D.E., Shah, K.V., & Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 709-720. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.709>
- Gissmann, L., Pfister, H., & zur Hausen, H. (1977). Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. *Virology*, 76, 567-580. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90239-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90239-2)
- Gissmann, L., & zur Hausen, H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *International journal of cancer*, 25(5), 605-609. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910250509>
- Gonzalez, J. V., Gutierrez, R. A., Keszler, A., Colacino, M.C., Alonio, L.V., Teyssie, A. R., & Picconi, M. A. (2007). Human Papillomavirus in oral lesions. *Medicina*, 67(4), 363-368. PMID: 17891932.
- Götz, C., Bischof, C., Wolff, K.D., & Kolk, A. (2019). Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years: A meta-analysis. *Molecular and clinical oncology*, 10(1), 17-28. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1749>
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev*, 772, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>

- Hormia, M., Willberg, J., Roukonen, H., & Syrjänen, S. (2005). Marginal periodontium as a potential reservoir of human papillomavirus in oral mucosa. *Journal of periodontology*, 76(3), 358–363. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.358>
- Howley, P. M., & Lowy, D.R. (2007). Papillomaviruses. In *Knipe DM (ed.) Virology* (5° ed., pp. 2299-2354). Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins: USA.
- Hübbers, C. U., & Akgül, B. (2015). Hpv and cancer of the oral cavity. *Virulence*, 244-248. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.999570>
- IARC. (1995). Human papillomaviruses. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 64, 1-378.
- IARC. (2007). Human papillomaviruses. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 90, 1-636.
- Instituto Nacional de Cáncer. (n.d.). *Estadísticas - Mortalidad- Incidencia*. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>. Argentina.gob.ar.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. (2014). Estimación/2014 – Incidencia de Câncer en Brasil. *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, INCA*. ISBN 978-85-7318-237-8
- Instituto Nacional del Cáncer. (2018). <https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>
- International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. (2021). <https://www.hpvcenter.se>
- Jiang, S., & Dong, Y. (2017). HPV and Oral Squamous Cell Carcinoma: A Review of HPV-positive OSCC and Possible Strategies for Future Review of Association between HPV Infection and Oral Cancer. *Current Problems in Cancer*, 41(5), 323-327. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2017.02.006>
- Joen, W.J., Park, S.W., Shin, M., Lee, Y.J., Jung, Y.H., Hah, J.H., Know, T.K., Song, Y.S., Song, Y.S., Kim, K.H., & Sung, M.W. (2009, Agosto). Presence of HPV type 6 in dysplasia and carcinoma arising from recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck.*, 31(8), 1095-101. <https://doi.org/10.1002/hed.20998>.
- Karolinska Institutet. (n.d.). International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. <https://www.hpvcenter.se>

- Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., & Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14), 1072–1079. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji187>
- Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(2), 467-475. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
- Lafaurie, G. I., Perdomo, S. J., Buenhora, M. R., Amaya, S., & Díaz-Báez, D. (2018). Human papilloma virus: An etiological and prognostic factor for oral cancer? *J Invest Clin Dent.*, 9(2). <https://doi.org/10.1111/jicd.12313>
- Laimins, L.A. (1998). Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. *American Society for Microbiology*, 201-223.
- La Vecchia, C., Tavani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G., Negri, E. (1997). Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral oncology*, 33(5). [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(97\)00029-8](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(97)00029-8)
- Lee, K.W., Kuo, W.R., Tsai, S.M., Wu, D.C., Wang, W.M., Fang, F.M., Chiang, F.Y., Ho, K.Y., Wang, L.F., Tai, C.F., Kao, E.L., Chou, S., Lee, H., Chai, C.h., & Ko, C.Y. (2005). Different impact from betel quid, alcohol and cigarette: risk factors for pharyngeal and laryngeal cancer. *International journal of cancer*, 117(5), 831-836. <https://doi.org/10.1002/ijc.21237>
- Lingen, M.W., Abt, E., Agrawal, N., Chaturvedi, A.k., Cohen, E., D'Souza, G., Gurenlian, J., Kalmar, J.R., Kerr, A.R., Lambert, P.M., Patton, L.L., Sollecito, T.P., Truelove, E., Tampi, M.P., Urquhart, O., Banfield, L., & Carrasco-Labra, A.J. (2017, Oct.). Evidence-based clinical practice guideline for the evaluation of potentially malignant disorders in the oral cavity: A report of the American Dental Association. *Journal of the American Dental Association*, 148(10), 712-727. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.07.032>
- Lingen, M.X., Xiao, W., Schmitt, A., Jiang, B., Pickard, R., Kreinbrink, P., Perez-Ordóñez, B., Jordan, R.C., & Gillison, M.L. (2013). Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity

squamous cell carcinomas. *Oral oncology*, 49(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.07.002>

- Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., & Roberts, S. (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head and neck*, 35(5), 747–755. <https://doi.org/10.1002/hed.22015>
- Miller, C.S., & White, D.K. (1996). Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.*, 82(1), 57-68. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(96\)80378-7](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(96)80378-7)
- Mirghani, H., Lang Kuhs, K.A., & Waterboer, T. (2018). Biomarkers for early identification of recurrences in HPV-driven oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 82, 108-114.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.05.015>
- Muñoz, N., Bosch, X., de SanJose, s., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, H. V., Snijders, P., & Meijer, C. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington, A., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(3), S1-S10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- Ndiaye, C., Mena, M., & Alemany, L. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Oncology*, 15(12), 1319–1331. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70471-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70471-1)
- NIH. (2018, Abril 9). *Cánceres de cabeza y cuello*. National Cancer Institute. Retrieved Mayo 22, 2021, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello>
- Paz, I.B., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y., & Wilczynski, S.P. (1997). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer*, 79(3), 595–604. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970201\)79:3<595::aid-cnrcr24>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19970201)79:3<595::aid-cnrcr24>3.0.co;2-y)
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., & H. A. Erlich. (1988, January). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-91. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>

- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., & Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3), 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., & Pawlita, M. (2008). Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5 \square and GP6 \square Primers. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 47(3), 1050–1059. <https://doi.org/10.1128/JCM.02227-07>
- Serna, B.Y., Carrillo, E.L., Rizo, V.H., & do Amaral, R.C. (2020). Comparación entre incidencias y factores de riesgo de cáncer oral en diferentes países de América Latina. *Revista de Salud Pública*, 26(2), 50-64. <https://doi.org/10.31052/1853.1180.v24n1>
- Smeets, S.J., Hesselink, A.T., & Speel, E.J. (2007). A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2465-2472. <https://doi.org/10.1002/ijc.22980>
- Stanley, M., Pinto, L.A., & Trimble, C. (2012). Human papillomavirus vaccines--immune responses. *Vaccine*, 30(5), F83-F87. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.106>
- Steinau, M., Patel, S. S., & Unger, E. R. (2011, July). Efficient DNA Extraction for HPV Genotyping in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(4), 377-381. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.03.007>
- Swiecicki, P.L., Malloy, K.M., & Worden, F.P. (2016). Advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma: Pathogenesis, treatment, and novel therapeutic approaches. *World Journal of clinical oncology*, 7(1), 15-26. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.15>
- Syrjänen, K., Syrjänen, S., Lamberg, M., Pyrhönen, S., & Nuutinen, J. (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *International journal of oral surgery*, 12(6), 418–424. [https://doi.org/10.1016/s0300-9785\(83\)80033-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9785(83)80033-7)
- Syrjänen, K.J., Syrjänen, S.M., Lamberg, M.A., & Pyrhönen, S. (1983). Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proceedings of the Finnish Dental Society*, 79, 1-8.
- Syrjänen, S. (2018). Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci*, 126, 49–66. <https://doi.org/10.1111/eos.12538>

- Tazal, M., Sullivan, M.A., Hyland, A., Marshall, J.R., Stoler, D., Reid, M.E., Loree, T.R., Rigual, N.R., Merzianu, M., Hauck, L., Lilis, C., Wactawski-Wende, J., & Scannapieco, F.A. (2009). Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(9), 2406–2412. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0334>
- Tezal, M. (2012). Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. *International journal of otolaryngology*, 575242. <https://doi.org/10.1155/2012/575242>
- Tezal, M., Sullivan Nasca, M., Stoler, D.L., Melendy, T., Hyland, A., Smaldino, P.J., Rigual, N.R., & Loree, T.R. (2009). Chronic periodontitis-human papillomavirus synergy in base of tongue cancers. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 135(4), 391-396. <https://doi.org/10.1001/archoto.2009.6>
- Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. (n.d.). Fisher Scientific. Retrieved April 24, 2021, from <https://www.fishersci.com/shop/products/nanodrop-one-spectrophotometer/13400518#>
- Tota, J.E., Anderson, W.F., Coffey, C., Califano, J., Cozen, W., Ferris, R.L., & Chaturvedi, A.K. (2017). Rising incidence of oral tongue cancer among white men and women in the United States, 1973–2012. *Oral Oncology*, 67, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.019>.
- Tumban, E. (2019). A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*, 11(10), 922. <https://doi.org/10.3390/v11100922>
- van den Brule, A. J., Pol, R., Francen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. L. M., & Snijders, P. J. F. (2002). GP5 \square /6 \square PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 779–787. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.3.779-787.2002>
- Vande Pol, S.B., & Klingelutz, A.J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445, 115-137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Van Doorslaer, K., Bernard, H.U., Chen, Z., de Villiers, E.M., zur Hausen, H., & Burk, R.D. (2011). Papillomaviruses: Evolution, Linnaean Taxonomy and Current Nomenclature. *Trends Microbiol.*, 19(2), 49-51. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.004>

- Westra, W.H., & Lewis, J.S. (2017). Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head and neck pathology*, 11(1), 41-47. <https://doi.org/10.1007/s12105-017-0793-2>
- Yete, S., D'Souza, W., & Saranath, D. (2017). High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*, 94(3), 133–141. <https://doi.org/10.1159/000485322>
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*, 36(2), 794.

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Comité de Ética.

COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS E
INSTITUTOS DE SALUD (ANLIS)

POE Nº 6 Versión 001
DE LAS TOMA DE DECISIONES Y COMUNICACIÓN DE LAS DECISIONES

Anexo 4

DICTAMEN

COMITE DE ETICA

ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD

Sr/a. Investigador/a principal: Dra. Maria Alejandra Picconi

Por la presente, le informamos que en la reunión del 8 de mayo de 2018 hemos revisado la documentación de su proyecto "Estudio del rol del Virus Papiloma Humano (HPV) en lesiones premalignas y malignas de cabeza y cuello" y los cambios solicitados por lo que el CEI ha decidido Aprobar los siguientes documentos:

Protocolo Versión 2 de fecha 9 de abril de 2018

Consentimiento Informado Versión 2 de fecha 9 de abril de 2018

Firma del Presidente del CEI

Aclaración Lic. MARIA CECILIA LUNA
Jefa Dpto. Genética Exp
Ctro. Nac. Genética

Fecha

08/05/18

POE 6: De la Toma de Decisiones y Comunicación de las Decisiones
Versión 001 Fecha

10. 2. Anexo 2: Planilla del registro de muestras.

ID*	Iniciales pacientes	Edad	Sexo (M/F)	Fecha del diagnóstico	Inmunocompromiso	Localización anatómica de la lesión	Histología del tumor escamoso	P16 (SI/NO)	Resultado p16
					No inmunocomprometido	Orofaringe	Queratinizante		
					No se sabe	Laringe	No queratinizante		
						Cavidad oral			
						Cavidad sinusal y senos	Especificar grado de diferenciación..		
						Paranasales			
						Especificar			
					No inmunocomprometido	Orofaringe	Queratinizante		
					No se sabe	Laringe	No queratinizante		
						Cavidad oral			
						Cavidad sinusal y senos	Especificar grado de diferenciación..		
						Paranasales			
						Especificar			
					No inmunocomprometido	Orofaringe	Queratinizante		
					No se sabe	Laringe	No queratinizante		
						Cavidad oral			
						Cavidad sinusal y senos	Especificar grado de diferenciación..		
						Paranasales			
						Especificar			
					No inmunocomprometido	Orofaringe	Queratinizante		
					No se sabe	Laringe	No queratinizante		
						Cavidad oral			
						Cavidad sinusal y senos	Especificar grado de diferenciación..		
						Paranasales			
						Especificar			
					No inmunocomprometido	Orofaringe	Queratinizante		
					No se sabe	Laringe	No queratinizante		
						Cavidad oral			
						Cavidad sinusal y senos	Especificar grado de diferenciación..		
						Paranasales			
						Especificar			

10. 3. Anexo 3: Planilla de trabajo para los cortes de tacos.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “ESTUDIO DEL ROL DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) EN CÁNCERES DE CABEZA Y CUELLO”.

(ESTUDIO RETROSPECTIVO)

PLANILLA DE TRABAJO DE CORTE DE TACOS

Institución:

Operador	Fecha de Corte	Orden de Corte	Nº Protocolo	Identificación del taco	Tubos ADN y ARN	Vidrios p16
		1			4	2
		2			4	2
		3			4	2
		4			4	2
		5			4	2
		6	BCC1 (I)		4	2
		7			4	2
		8			4	2
		9			4	2
		10			4	2
		11			4	2
		12	BCC1 (II)		4	2

* **BCC: bloque de control de contaminación (Tacos de parafina solo):**

- **BCC 1: Cambiar la cuchilla** (cuchilla nueva): Cortar el taco de parafina con una cuchilla nueva y colocar 1 rulo por tubo (**taco A**).

10. 4. Anexo 4: Listado de cebadores usados para la PCR BSGP5+/6+Biot.

Identificación de los cebadores		Secuencia nucleotídica [5'→ 3']
Cebadores no marcados		
GP5+	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
BSGP5+-2	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-3	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACC AC
BSGP5+-4	F	TTT GTT ACT TGT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-5	F	TTT TTA ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-6	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAC ACT AC
BSGP5+-7	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAC ACT AC
BSGP5+-8	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAT ACC AC
BSGP5+-9	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC AC
MS ₃ (β Globina)	F	AAT ATA TGT GTG CTT ATT TG
Cebadores marcados con biotina en el extremo 5'		
Bio-GP6+	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C
Bio-BSGP6+-b	R	GAA AAA TAA ATT GTA AAT CAT ACT AC
Bio-BSGP6+-c	R	GAA AAA TAA ATT GCA ATT CAT ATT C
Bio-MS ₁₀ (β Globina)	R	AGA TTA GGG AAA GTA TTA GA

10. 5. Anexo 5: Listado de oligosondas tipo-específicas utilizadas para la genotipificación.

Identificación de la sonda	Secuencia nucleotídica [5'→ 3']
P6 RLB	TCC GTA ACT ACA TCT TCCA
P11 RLB	TCT GTG TCT AAA TCT GCT AC
P16 RLB	CAT TAT GTG CTG CCA TAT C
P18 RLB	TGC TTC TAC ACA GTC TCC T
P26 RLB	GTA CAT TAT CTG CAG CAT C
P31 RLB	GCA ATT GCA AAC AGT GAT AC
P33 RLB	TGC ACA CAA GTA ACT AGT GA
P34 RLB	TTT TCA GTT TGT GTA GGT ACA
P35 RLB	CTG CTG TGT CTT CTA GTG A
P39 RLB	ATA GAG TCT TCC ATA CCT TC
P40 RLB	AGT CCC CCA CAC CAA CC
P42 RLB	TGG TGA TAC ATA TAC AGC TG
P43 RLB	TCT ACT GAC CCT ACT GTG
P44 RLB	TAC TAG TGA ACA ATA TAA GCA
P45 RLB	TAA TTT AAC ATT ATG TGC CTC
P51 RLB	TGC TGC GGT TTC CCC AA
P52 RLB	GAA TAC CTT CGT CAT GGC
P53 RLB	TGT CTA CAT ATA ATT CAA AGC
P54 RLB	CAC GCA GGA TAG CTT TAA T
P55 RLB	TCA GTC TCC ATC TAC AAC AT
P56 RLB	CAG AAC AGT TAA GTA AAT ATG
P57 RLB	CCA CAG AAA CTA ATT ATA AAG

P58 RLB	TAT GCA CTG AAG TAA CTA AG
P59 RLB	TCT ACT ACT GCT TCT ATT CC
P61 RLB	CCC CCC CTG TAT CTG AAT
P66 RLB	AGC TAA AAG CAC ATT AAC TAA
P68 RLB	CTG AAT CAG CTG TAC CAA T
P70 RLB	GAA ACG GCC ATA CCT GCT
P71 RLB	TGC TAC CAA AAC TGT TGA G
P72 RLB	AGC GTC CTC TGT ATC AGA A
P73 RLB	ACA GGC TAG TAG CTC TAC T
P81 RLB	GCT ACA TCT GCT GCT GC
P82 RLB	ACT GCT GTT ACT CAA TCT G
P83 RLB	TAC ACA GGC TAA TGA ATA CA
P84 RLB	TGC TAC CAA CAC CGA ATC A
P89 RLB	CTT CCC AGT CTG CCA CA
β Globina	CTT CTT TTA ATA TAC TTT TTT GTT
Cq	NNN NNN NNN NNN NNN NNN NN

10.6. Anexo 6: Listado de cebadores usados para la PCR de beta globina humana.

Identificación	Secuencia nucleotídica 5'→3'	Modificación	Tamaño
PCR-Globina (Saiki et al., 1991)			
PC03	ACACAACCTGTGTTCACTAGC		158 pb
KM38	TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG		