

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Prevalencia del virus del papiloma humano, virus Epstein-Barr y poliomavirus de células de Merkel en tumores de cavidad oral y orofaringe de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México

Por

QFB. Luis Roberto Galindo Méndez

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

2023

Prevalencia del virus del papiloma humano, virus Epstein-Barr y poliomavirus de células de Merkel en tumores de cavidad oral y orofaringe de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México

Comité de Tesis



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Presidente



Dra. Vianey González Villasana

Secretario



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

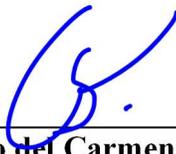
Prevalencia del virus del papiloma humano, virus Epstein-Barr y poliomavirus de células de Merkel en tumores de cavidad oral y orofaringe de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México

Dirección de Tesis



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director



Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo

Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

El presente trabajo se realizó gracias a las facilidades prestadas por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en:

- El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología en la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. con el Dr. José Manuel Vázquez Guillén como Director del proyecto de tesis.
- La Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo como Director Externo del proyecto de tesis.
- El Laboratorio Medicina Diagnóstica S.A. de C.V. Servicios Integrales de Análisis Clínicos, Citopatología, Anatomía Patológica y Oncología Diagnóstica. Av. Simón Bolívar 1333, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N. L., CP 64460, México con el Dr. Ángel Zavala Pompa como asesor especialista.
- La Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López, Q.C.B Patricia Villarreal Quiroga y el M.C. Jorge Sepúlveda.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo contó con el financiamiento por parte de:

- El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.
- UANL con el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Dirección de Investigación, Secretaría de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico de la U.A.N.L clave 178-CS-2022.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por todas las oportunidades que, a través del Laboratorio de Inmunología y Virología, me brindó para la realización de una Maestría en Ciencias.

A la UMAE No. 25 del IMSS, el Laboratorio Medicina Diagnóstica S.A. de C.V. y al CIDICS de la UANL por las facilidades brindadas.

Al Dr. José Manuel Vázquez Guillén por abrirme las puertas de su laboratorio y guiarme en la realización de este proyecto.

Al Dr. Gerardo Palacios Saucedo por el apoyo que me brindo y las palabras de aliento.

A mis compañeros de laboratorio Aldo, Alondra, Alonso, Ceres y Leticia por las enseñanzas y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Lydia Rivera Morales, la Dra. Vianey González Villasana y la Dra. Ana Carolina Martínez por las valiosas aportaciones y observaciones que enriquecieron este trabajo.

Al MC. Jorge, la Quím. Patricia Villarreal y la Dra. Rocío Ortiz López por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Adrián Moncada, a la Dra. Silvia Hernández y al Dr. Edmundo Castelán por su apoyo en la recolección y revisión de las muestras.

Al Dr. Ángel Zavala y su equipo del laboratorio Medicina Diagnóstica por las facilidades brindadas y el apoyo para la realización del presente trabajo.

A mi esposa por tanto amor, paciencia y por sus palabras de aliento. Sin ella nada de esto hubiera sido posible.

A mis familiares y amigos por el apoyo incondicional que siempre me brindan.

DEDICATORIA

Para Celeste mi esposa, compañera y amiga, en quien puedo confiar y con quien sé que cuento siempre.

Para mi hija Elena quien me impulsa cada día a seguir siendo una mejor versión de mí.

ÍNDICE

Índice de Tablas.	I
Índice de Figuras.	II
Lista de símbolos y abreviaturas.	III
Resumen.	V
Abstract.	VI
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	2
2.1. Tumores de cabeza y cuello.	2
2.2. Anatomía de la cavidad oral y orofaringe.	2
2.3. Tumores de cavidad oral y orofaringe.	3
2.4. Factores de riesgo y clasificación de los tumores de cavidad oral y orofaringe.	3
2.5. Diagnóstico y tratamiento de los tumores de cavidad oral y orofaringe.	5
2.6. Virus oncogénicos.	6
2.6.1. Virus del papiloma humano.	7
2.6.2. Virus de Epstein-Barr.	8
2.6.3. Poliomavirus de células de Merkel.	9
3. Justificación.	11
4. Hipótesis.	12
5. Objetivos.	13
5.1. Objetivo general.	13
5.2. Objetivos específicos.	13
6. Material y métodos.	14
6.1. Diseño del estudio.	14
6.2. Conjunción del grupo de estudio.	14
6.3. Extracción de ADN.	14
6.4. Detección y genotipificación del VPH.	15
6.5. Detección del VEB y PVCM.	17
6.6. Análisis estadístico.	18
7. Resultados.	19
7.1. Características clínico-epidemiológicas del grupo de estudio.	19
7.2. Detección y genotipificación del VPH en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe.	21
7.3. Detección del VEB en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe.	23
7.4. Detección del PVCM en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe.	25
8. Discusión.	26
9. Conclusiones.	30
10. Perspectivas.	31
11. Bibliografía.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No	Título	Página
1	Clasificación T de tumores de cavidad oral y orofaringe.	4
2	Tabla 2. Clasificación N de tumores de cavidad oral y orofaringe.	5
3	Tabla 3. Clasificación de los genotipos de VPH según el riesgo oncogénico.	7
4	Tabla 4. Proteínas oncogénicas del virus de Epstein-Barr.	9
5	Tabla 5. Condiciones de amplificación.	15
6	Tabla 6. Oligonucleótidos dirigidos a la región LMP2 del VEB y VP1 de PVCM.	18
7	Tabla 7. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y detección de VPH y VEB.	20
8	Tabla 8. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes positivos a VPH.	22
9	Tabla 9. Características clínico-epidemiológicas de pacientes positivos a VEB.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No	Título	Página
1	Anatomía de la cavidad oral y orofaringe.	2
2	Patrón de bandas para determinar genotipo.	17

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo o Abreviatura	Equivalencia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
mm	Milímetro
°C	Grado Celsius
nm	Nanómetro
uL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
ml	Mililitro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
con	Solución de conjugado
rin	Solución de enjuague
nbt/bcip	Solución de revelado
pb	Pares de bases
Estadio tumoral (T)	Se basa en el tamaño y profundidad de la invasión del tumor
Estadio tumoral (N)	Propagación tumoral a los ganglios linfáticos y su extensión fuera de los ganglios linfáticos
Estadio tumoral (M)	Presencia de metástasis lejana
CaCOyO	Cáncer de Cavidad Oral y Orofaringe
CCM	Carcinoma de células de Merkel
CCE	Carcinoma de células escamosas
CTLA-4	antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DOI	profundidad de la invasión
ENE	extensión extra ganglionar
FFEP	fijado en formalina y embebido en parafina

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ORF	marco de lectura abierto
PD-1	proteína de muerte programada 1
PD-L1	ligando 1 de la proteína de muerte programada
PVCM	poliomavirus de células de Merkel
TCOyO	tumores de cavidad oral y orofaringe
TST	gen de tiosulfato sulfuro transferasa
UMAE	Unidad médica de alta especialidad
VEB	virus de Epstein-Barr
VPH	virus del papiloma humano
VPH-AR	genotipos de alto riesgo oncogénico del virus del papiloma humano
VPH-BR	genotipos de bajo riesgo oncogénico del virus del papiloma humano

RESUMEN

Introducción: Los tumores de la cavidad oral y orofaringe (TCOyO) son los más frecuentes dentro del grupo denominado como cánceres de cabeza y cuello y de estos, el 90% corresponden a carcinomas de células escamosas (CCE). El origen de estos tumores es multifactorial y los factores de riesgo más comunes son el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol, sin embargo, una posible etiología viral es también sugerida. Oncovirus, como el virus del papiloma humano (VPH), el virus de Epstein-Barr (VEB) o el poliomavirus de células de Merkel (PVCM), han sido relacionados con la génesis de diversos CCE ya que son capaces de promover mutaciones por la inserción de su ADN en el genoma humano, pero su participación en carcinomas de cavidad oral y orofaringe no está aun claramente establecida. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la prevalencia de infecciones por VPH, VEB y PVCM en muestras de pacientes con diagnóstico de tumor de cavidad oral y orofaringe de una Unidad Médica de tercer nivel de atención del Noreste de México. Se colectaron muestras de tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina de pacientes con diagnóstico de tumor de cavidad oral u orofaringe procesadas en el periodo de agosto de 2017 a agosto de 2020 por los Departamentos de Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad N° 25 del IMSS. Se recabaron los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes por indagatoria en los expedientes clínicos. Se determinó la presencia y los genotipos del VPH y la presencia del VEB y del PVCM. Se detectó la presencia de VPH y VEB en muestras de pacientes con diagnóstico de Cáncer de cavidad oral y orofaringe, se encontraron prevalencias de 34.1% y 14.6% respectivamente, el PVCM no fue detectado en ninguna de las muestras. Se determinó la presencia de genotipos de alto riesgo en el 100% de las muestras positivas para VPH, siendo el genotipo 16 el que contaba con mayores incidencias. La coinfección por VPH y VEB se encontró en el 11% de las muestras. La prevalencia de infecciones por VPH es similar a las reportadas en otros países. La prevalencia de VEB y PVCM es diferente a la reportada en la literatura. Las coinfecciones en el Noreste de México tienen una baja prevalencia.

ABSTRACT

Introduction: Tumors of the oral cavity and oropharynx are the most frequent within the group denominated as head and neck cancers and of these, 90% correspond to squamous cell carcinomas (SCC). The origin of these tumors is multifactorial and the most common risk factors are smoking and excessive alcohol consumption, however, a possible viral etiology is also suggested. Oncoviruses, such as human papillomavirus (HPV), Epstein-Barr virus (EBV) or Merkel cell polyomavirus (MCPV), have been linked to the genesis of various SCCs as they are able to promote mutations by insertion of their DNA into the human genome. Among the proteins affected by these mutations are p53 and pRB, which are involved in cell cycle control. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the prevalence of HPV, EBV and PVCVM infections in samples from patients diagnosed with oral cavity or oropharyngeal tumors in a tertiary level medical unit in Northeastern Mexico. **Methodology:** Formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue samples were collected from patients with a diagnosis of oral cavity or oropharyngeal tumor processed in the period from August 2017 to August 2020 by the Departments of Otorhinolaryngology and Anatomic Pathology of the High Specialty Medical Unit No. 25 of the IMSS. The clinical-epidemiological data of the patients were collected by inquiry in the clinical records. The presence and genotypes of HPV and the presence of EBV and PVCVM were determined. **Results:** HPV and EBV were detected in samples from patients diagnosed with oral cavity and oropharyngeal cancer, with prevalences of 34.1% and 14.6%, respectively; PVCVM was not detected in the samples. The presence of high-risk genotypes was determined in 100% of the HPV-positive samples, with genotype 16 being the one with the highest incidence. Coinfection with HPV and EBV was found in 11% of the samples. **Conclusion:** The prevalence of HPV infections is similar to those reported in other countries. The prevalence of EBV and PVCVM is different from that reported in the literature. Coinfections in Northeastern Mexico have a low prevalence.

1. INTRODUCCIÓN

Los tumores de cabeza y cuello son el séptimo lugar en incidencias a nivel mundial, esto representa el 5.3% de todos los tipos de cáncer, siendo los tumores de cavidad oral los más comunes, seguido de los tumores de laringe y orofaringe (Aupérin 2020, Duhll *et al.* 2018). Los factores de riesgo asociados a los tumores de cavidad oral y orofaringe (TCOyO) son diversos encontrándose entre los factores más importantes el consumo en exceso de bebidas alcohólicas y tabaco. (Moro *et al.* 2018, Faria *et al.* 2020). Durante ya varios años se ha observado como las infecciones virales ayudan al desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los virus que se han asociado a tumores destacan el papilomavirus humano (VPH), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus linfotrópico humano de células T, el poliomavirus de células de Merkel (PVCM), virus del sarcoma de Kaposi, entre otros. El VPH se ha encontrado ampliamente en los carcinomas de células escamosas de orofaringe en especial los genotipos de alto riesgo (VPH-AR) (Valls-Ontañón *et al.* 2019, You *et al.* 2019). El VEB infecta principalmente linfocitos B y algunos tipos de células epiteliales, por lo tanto, se ha asociado a diversos tipos de linfomas de células B y carcinomas. En los tumores de cabeza y cuello se ha asociado con el desarrollo de carcinoma de nasofaringe (Farrel 2019). El PVCM se ha descrito como el agente causal del carcinoma de células de Merkel (CCM), un carcinoma de la piel muy agresivo y poco común. A pesar de que este poliomavirus se encuentra como parte del microbioma normal de la piel y que raramente causa una transformación maligna, en pacientes con CCM, se ha observado que puede aumentar el riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer (Hamiter *et al.* 2017, Ahmed *et al.* 2022). Al ser las infecciones virales causantes de diversos tipos de cáncer, es importante estudiar los efectos de coinfecciones en el desarrollo de tumores para proponer medidas de vigilancia epidemiológica, así como desarrollar métodos de detección temprana de tumores y estratificación de riesgo para los pacientes, por esto el objetivo del presente estudio es investigar la prevalencia de las infecciones por VPH, VEB y PVCM, así como el impacto de la coinfección en los estadios tumorales de pacientes con TCOyO.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tumores de cabeza y cuello.

Los tumores originados en la región de la cabeza y cuello son heterogéneos, la mayoría de estos tumores son carcinomas de células escamosas (CCE) que derivan de las mucosas de la cavidad oral, laringe, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y el tracto sino nasal, de estos los de cavidad oral son los más comunes. Este tipo de tumores tienen una frecuencia más alta en varones que en mujeres (1.75 a 5.75:1 dependiendo de la zona anatómica), la incidencia varía entre diferentes regiones siendo el sur de Asia la región con mayores tasas de incidencia, seguido de Norte América y Europa, esto se debe a la exposición de diversos carcinógenos, entre ellos, los derivados del tabaco (Aupérin 2020; Jhonson *et al.* 2020; Chow 2020).

2.2 Anatomía de la cavidad oral y orofaringe.

La cavidad oral está compuesta por los labios, el paladar duro, el reborde alveolar superior e inferior, las encías, la región sublingual o piso de la boca, la mucosa bucal o mejilla intraoral, trigono retromolar y los dos tercios anteriores de la lengua. La orofaringe se compone de la base de la lengua, paladar blando, las amígdalas y la pared faríngea, en la **Figura 1** se representa su localización anatómica (Vogel *et al.* 2010; Guzman *et al.* 2011; Ketabat *et al.* 2019).

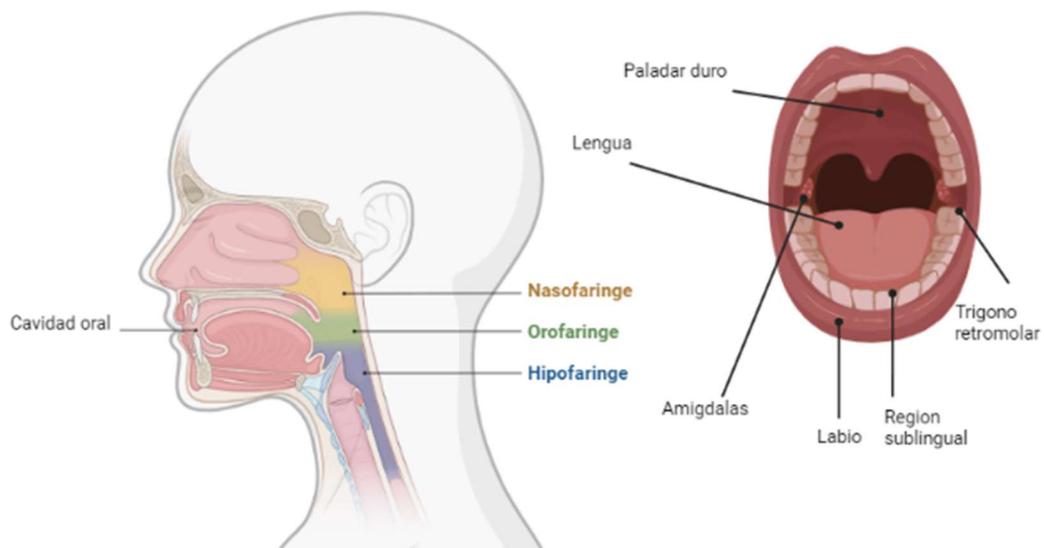


Figura 1. Anatomía de la cavidad oral y la orofaringe. Modificado de Head and Neck anatomy by BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

2.3 Tumores de cavidad oral y orofaringe.

Existen distintos tipos de tumores que se pueden desarrollar en la cavidad oral y orofaringe, de ellos el más común es el CCE que representa más del 90% de los casos, los casos restantes se deben a linfomas u otros tipos de tumores menos comunes como melanomas, liposarcomas, angiosarcoma, entre otros (Vogel *et al.* 2010). El CCE por lo regular se desarrolla en una serie de pasos ordenados empezando como una hiperplasia de células epiteliales, después una displasia, seguido de la formación del carcinoma *in situ* para terminar en un carcinoma invasivo. Es necesario notar que una gran cantidad de pacientes diagnosticados con CCE no contaban con antecedentes de lesión premaligna, esto dificulta la detección temprana del tumor impactando negativamente en el pronóstico (Jhonson *et al.* 2020).

2.4 Factores de riesgo y clasificación de los tumores de cavidad oral y orofaringe.

La aparición de tumores de cavidad oral y orofaringe se ha asociado a diferentes factores, estos pueden ser de conductas, como el consumo en exceso de alcohol y tabaco, una mala dieta, una higiene deficiente, entre otras; en diferentes estudios se ha observado el papel del microbioma como factor de riesgo, así como las infecciones virales, siendo la infección por virus del papiloma humano el factor de riesgo biológico más documentado (Al-Hebshi *et al.* 2019; Faria *et al.* 2020). Para clasificar los tumores sólidos se utiliza el sistema de estadios TNM diseñado por Pierre Denoix en 1944, este sistema se utiliza para clasificar los tumores antes de cualquier tratamiento (cTNM), después de tratamiento quirúrgico (pTNM), y en recaídas del tumor (rTNM) para agrupar al paciente en algún grupo de riesgo y elegir el manejo más adecuado para el paciente. La clasificación T de los tumores de cavidad oral y de orofaringe se basa en el tamaño y profundidad de invasión del tumor (DOI: depth of invasión) (**tabla 1**), la clasificación N se basa en la propagación a ganglios linfáticos y la extensión tumoral fuera de los ganglios linfáticos (ENE: extra nodal extension) (**tabla 2**), la clasificación M se refiere a la presencia de metástasis lejana (Kato *et al.* 2020; Speight y Farthing 2018; Zanoni *et al.* 2019; Ettinger *et al.* 2019).

Tabla 1. Clasificación T de tumores de cavidad oral y orofaringe. DOI: profundidad de invasión

Categoría	Criterios cavidad oral	Criterios orofaringe
Tx	No se puede evaluar el tumor primario	
T0		p16 (+) en ganglios cervicales, pero no se identifica tumor <i>in situ</i>
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤ 2 cm, DOI ≤ 5 mm	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor ≤ 2 cm, DOI > 5 mm y ≤ 10 mm, o tumor > 2 cm, pero ≤ 4 cm, DOI ≤ 10 mm	Tumor > 2 cm, pero ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm o cualquier tumor con DOI > 10 mm	Tumor > 4 cm o con extensión a la epiglotis
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada (invasión de estructuras adyacentes: hueso cortical, piel de la cara, seno maxilar).	Enfermedad local moderadamente avanzada (invasión de laringe, músculos extrínsecos de la lengua, pterigoides medio, paladar duro o mandíbula).
T4b	Enfermedad local muy avanzada (invasión de espacio masticador, placas pterigoides, base del cráneo o revestimiento de la arteria carótida interna)	

Tabla 2. Clasificación N de tumores de cavidad oral y orofaringe. ENE: extensión fuera de los ganglios linfáticos.

Categoría	Cavidad oral	Orofaringe
NX	Ganglios regionales no se pueden evaluar	Ganglios regionales no se pueden evaluar
N0	No existe metástasis en ganglios regionales	No existe metástasis en ganglios regionales
N1	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral ≤ 3 cm, ENE (-)	Metástasis a uno o más ganglios ipsilaterales ≤ 6 cm
N2	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral > 3 cm y ≤ 6 cm y ENE (-); o metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales ≤ 6 cm y ENE (-); o en ganglios bilaterales o contralaterales ≤ 6 cm y ENE (-)	Metástasis a ganglios contralaterales o bilaterales ≤ 6 cm
N2a	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral > 3 cm y ≤ 6 cm y ENE (-)	
N2b	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales ≤ 6 cm y ENE (-)	
N2c	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales ≤ 6 cm y ENE (-)	
N3	Metástasis en un ganglio > 6 cm y ENE (-); o metástasis en cualquier ganglio(os) con ENE (+)	Metástasis a ganglios > 6 cm
N3a	Metástasis en un ganglio > 6 cm y ENE (-)	
N3b	Metástasis en cualquier ganglio(os) con ENE (+)	

2.5 Diagnóstico y tratamiento de los tumores de cavidad oral y orofaringe.

Para realizar un diagnóstico adecuado de estos tumores se requiere analizar diversos aspectos clínicos, se debe de evaluar clínicamente la zona afectada, así como recabar todos los antecedentes clínico-epidemiológicos del paciente, se debe efectuar una tomografía de la zona afectada y/o una resonancia magnética para evaluar el tamaño, grosor y profundidad del tumor, después del estudio radiológico se debe realizar una biopsia para determinar la línea germinal del tumor existente. Se puede evaluar adicionalmente factores moleculares del tumor como la expresión de p16 en el caso de tumores de orofaringe, así como PD-L1 en caso de tumores recurrentes. (Vogel *et al.* 2010; Chow 2020; Machiels *et al.* 2020). Para el tratamiento de estos tumores se utilizan la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, solas o en combinación. La cirugía se utiliza como primera opción, puede ser parcial o completa, esto depende del estadio tumoral en el que se encuentra el paciente. Como segunda opción se utiliza la radioterapia, o como consolidación después de la

cirugía, en el caso de resección completa, se utiliza como tratamiento de consolidación, cuando se trata de resecciones parciales, se combina con radioterapia/quimioterapia para alcanzar la erradicación tumoral restante, los quimioterapéuticos más utilizados contra estos tumores son la doxorubicina y el cisplatino (Machiels *et al.* 2020; Ketabat *et al.* 2019; Irimie *et al.* 2017; Lin 2017). En el caso de pacientes con tumores metastásicos o refractarios/recurrentes se utiliza principalmente la inmunoterapia, los anticuerpos monoclonales cetuximab (anti- HER1), nivolumab y pembrolizumab (anti-PD-1) son los agentes autorizados por la FDA para tratar a este tipo de tumores (Jhonson *et al.* 2020). El tratamiento elegido depende de distintas características del paciente como el estadio tumoral, la condición general, la edad, en el caso de tumores de orofaringe, la infección por VPH, entre otras. Debido a que la enfermedad por sí misma causa destrucción de estructuras anatómicas adyacentes, por su patrón de crecimiento invasivo, se generan en el paciente distintas secuelas que disminuyen su calidad de vida. Las funciones que se ven afectadas por el tumor incluyen el deglutir, respirar, toser y hablar. Estas funciones también se ven afectadas con los tratamientos utilizados al cambiar la configuración anatómica de los tejidos involucrados (Machiels *et al.* 2020; Ketabat *et al.* 2019; Pezdirec *et al.* 2019).

2.6 Virus oncogénicos.

Las infecciones virales son las causantes de diversas enfermedades en el ser humano, estas enfermedades pueden ir desde un cuadro clínico leve como en el resfriado común, hasta enfermedades mortales como la causada por el ébola, la hepatitis, entre otras. En las últimas décadas se han asociado cada vez más las infecciones virales con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, esto debido a su potencial como carcinógenos al generar mutaciones en proteínas reguladoras del ciclo celular, provocar la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la supervivencia (inmortalización celular), etc. Esto lo logran de diferentes maneras, algunos virus al insertar su material genético en la célula hospedera puede causar mutaciones aleatorias que produzcan la inactivación de genes de puntos de control, también la interacción de las proteínas virales con proteínas de la célula hospedera puede provocar la inactivación o el aumento en la actividad de dichas proteínas del hospedero.

2.6.1 Virus del Papiloma Humano

Los papilomavirus son virus de ADN de doble cadena, no encapsulado, de forma icosaédrica que infecta células epiteliales y las regiones mucosas de humanos y animales. Esta familia se clasifica en 5 géneros (α , β , γ , μ , ν) y se conocen hasta el momento más de 200 genotipos. El genoma viral se divide en 3 regiones: la región temprana de proteínas reguladoras (E), la región tardía de proteínas estructurales (L) y la región reguladora río arriba (Vonsky *et al.* 2019; Yete *et al.* 2017; Tumban 2019).

El virus del papiloma humano (VPH) en su región temprana de proteínas reguladoras codifica para las dos principales oncoproteínas E6 y E7, estas proteínas están reguladas por la expresión de la proteína E2, los genotipos que integran su ADN al hospedero inactivan la expresión de E2 promoviendo la expresión de E6 y E7. Se clasifica el genotipo viral según su potencial oncogénico en alto riesgo (VPH-AR) y bajo riesgo (VPH-BR), los genotipos de bajo riesgo son asociados a lesiones benignas como verrugas o papilomatosis, en cambio los de alto riesgo están relacionados con neoplasias (Tumban 2019; de Sanjosé *et al.* 2018).

Los VPH-AR tienen distintas formas de evadir al sistema inmune, algunas de ellas son la producción de bajas copias dentro de la célula hospedera, regulación de la vía de señalización de interferón, inhibición de moléculas de adhesión, etc.; esto disminuye la capacidad de atraer diferentes células inmunitarias, como células de Langerhans, lo cual promueve la prevalencia viral y aumenta la probabilidad de progresar al estado neoplásico (de Sanjosé *et al.* 2018).

Tabla 3. Clasificación de los genotipos de VPH según el riesgo oncogénico.

Clasificación	Genotipos
Alto riesgo	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82.
Bajo riesgo	6, 11, 40, 41, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, etc.

2.6.2 Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein- Barr (VEB), también conocido como gamaherpesvirus humano 4, pertenece a la familia de los herpes virus, su genoma esta compuesto por ADN de doble cadena lineal y presenta tropismo hacia células epiteliales y linfocitos B. Se estima que más del 90% de la población adulta mundial se encuentre infectada. El VEB está clasificado según la OMS como un carcinógeno clase I, ya que, se ha asociado con diversos tipos de cáncer como linfoma de Burkitt, cáncer nasofaríngeo, cáncer gástrico, entre otros (Ayee *et al.* 2020; Farrell 2019; Münz 2019).

El genoma viral contiene aproximadamente 85 marcos abiertos de lectura, estos codifican para diferentes proteínas tanto de la fase lítica, como de la fase de latencia, además el genoma codifica para distintos ARN pequeños no codificantes funcionales. En la **tabla 4** se presentan las proteínas implicadas en la transformación maligna y sus principales blancos (Ayee *et al.* 2020; Farrell 2019; Münz 2019).

El virus presenta dos fases la lítica y de latencia, como otros herpesvirus en la fase lítica o productiva se replica el genoma viral para producir nuevas partículas virales, en la fase de latencia el virus replica su genoma, pero sin producir nuevas partículas virales, esto lo consigue integrando su genoma al del hospedero quedando como un provirus o formando un episoma no integrado circular en el núcleo que expresa solo ciertos genes que dirigen la supervivencia de la célula hospedera (Ayee *et al.* 2020; Farrell 2019; Münz 2019).

Tabla 4. Proteínas oncogénicas del virus de Epstein-Barr.

Proteína	Fase viral	Blanco	Actividad biológica
EBNA-1	Latencia I, II y III	ADN en secuencias específicas (sitios con secuencias palindrómicas).	Se une al origen de replicación para promover la replicación del ADN, ayuda a la segregación del ADN viral en las progenies.
EBNA-2	Latencia III	Factores de transcripción (CBF1/RBP-Jk, PU.1, entre otros).	Aumenta la producción de genes asociados con la proliferación y supervivencia de las células.
EBNA-3	Latencia III	Factores de transcripción.	Reprimen la actividad de p16 y de BIM.
EBNA-LP	Latencia III	pRb, p53, p14ARF, HA95, proteincinasas dependientes de ADN, HAX-1, entre otros.	Promueven la oncogénesis, reguladores del ciclo celular, inhibe la apoptosis.
LMP-1	Latencia II y III	TRAF-1 a 6.	Activa ERK, MAPK, PI3K/Akt, JNK, p38, NF-κB, JAK/STAT, provocando proliferación y supervivencia de las células, además promueve la metástasis e invasividad.
LMP-2	Latencia II y III		Señal de supervivencia, inhibe señalización para reactivación lítica, previene apoptosis, ayuda al escape de eliminación por T CD8 ⁺ .

2.6.3 Poliomavirus de Células de Merkel

El poliomavirus de células de Merkel (PVCMM) es un virus de ADN de doble cadena circular, su genoma codifica para regiones genéticas tempranas y tardías. En la región temprana se codifican los genes para los antígenos T (uno grande LT y uno corto sT), los

cuales se expresan inmediatamente durante la infección viral y hasta la replicación del ADN viral. En la región tardía se codifican los genes de la cápside viral (VP1, VP2 y VP3). Tanto la proteína LT como la sT se unen a proteínas de choque térmico del hospedero, y la proteína LT se conoce por tener un motivo de unión a Rb lo cual produce la inactivación de esta proteína supresora de tumores (Spurgeon *et al.* 2021, 2022; Becker *et al.* 2019; Ahmed *et al.* 2022; Wu *et al.* 2019).

El PVCM se identificó por primera vez en muestras de pacientes con CCM, este es un tumor de la piel muy agresivo con muy baja incidencia, los factores de riesgo asociados a este tumor son la exposición prolongada a luz UV, la inmunosupresión, la edad avanzada y la infección por este poliomavirus (Ahmed *et al.* 2022; Wu *et al.* 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Los TCOyO son un grave problema de salud. Gracias a los esfuerzos mundiales por disminuir el consumo de tabaco, la incidencia de este tipo de tumores no ha aumentado, sin embargo, se ha encontrado un incremento en casos de pacientes jóvenes con este tipo de tumores. Es posible que una de las causas de este incremento sea debido al aumento en la incidencia de infecciones por virus con potencial oncogénico. Observar la prevalencia de infecciones virales, así como sus coinfecciones en pacientes con TCOyO puede contribuir para proponer medidas de prevención y detección temprana.

4. HIPÓTESIS

Se encontrará una alta prevalencia del VPH y es posible establecer alguna correlación entre la presencia de VPH-AR, la co-infección por VEB o PVCM y el estado clínico de pacientes con diagnóstico de TCOyO de una unidad médica de tercer nivel del Noreste de México.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la presencia y genotipos del VPH, y la co-infección por los VEB y PVCM en muestras de pacientes con diagnóstico de TCOyO de una unidad médica de tercer nivel del Noreste de México.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de la infección por VPH e identificar los genotipos de alto riesgo presentes en TCOyO.
- Determinar la prevalencia de la infección y co-infección por el VEB y el PVCM en TCOyO.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, transversal, descriptivo y retrospectivo.

6.2. Conjunción de grupo de estudio.

Se conjuntaron muestras fijadas con formol y embebidas en parafina (FFEP) de tumores de cavidad oral y orofaringe de pacientes de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del periodo de agosto del 2017 agosto del 2020. Los especímenes clínicos fueron preparados por el departamento de Otorrinolaringología y Oncología Quirúrgica y procesadas por el Departamento de Anatomía Patológica. Se incluyeron muestras que cumplieron con los criterios de inclusión y con historial clínico completo. Los datos clínico-epidemiológicos, como edad, sexo, sitio tumoral, subsitio anatómico, tipo de resección, diagnóstico histopatológico, evolución, estadio tumoral, consumo de tabaco y consumo de alcohol, fueron recabados por indagatoria en el expediente clínico del paciente.

El estudio contó con dictamen de aprobación de Ética e Investigación por el Comité Local de Investigación en Salud No. 1901 del IMSS con registro R-2021-1901-065. No fue necesario solicitar el consentimiento informado del paciente debido a que es un estudio retrospectivo en el cual se tomaron muestras del banco de tumores de la UMAE No. 25. Los datos específicos del paciente se han resguardado con confidencialidad asegurando el anonimato de los pacientes.

6.3. Extracción de ADN

A los especímenes FFEP recolectados se les tomo una muestra de 2 mm con sacabocados de la zona tumoral, se procedió a realizar una extracción de ADN con el kit nucleospin DNA FFPE XS (Macherey–Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. Primero se realizó un proceso para remover la parafina del tejido con solución disolvente a 60°C por 3 min, posteriormente se lisaron las células

utilizando proteinasa K y se dejó incubar por 3 h, para finalizar se purificó el ADN mediante columnas de afinidad realizando lavados y elución de la muestra. Se determinó la pureza y concentración del ADN mediante espectrofotometría 260 y 280 nm con el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA).

6.4. Detección y genotipificación del VPH

Para detectar el material genético del VPH en las muestras y además determinar su genotipo se utilizó el kit AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v3.0 (AB Analitica, Padua, Italia). Este kit emplea cebadores específicos biotinilados para amplificar un fragmento de la región L1 del genoma viral. Los amplicones resultantes se desnaturalizan e hibridan con sondas específicas fijadas en tirillas, que tienen capacidad para identificar hasta 41 genotipos diferentes del virus. Las tirillas cuentan con un control de la extracción de ADN (gen TST) y un control positivo (plásmido con fragmento del VPH 61).

La amplificación de la región L1 se llevó a cabo mediante una reacción de PCR punto final con el reactivo HPV- TYPE EXPRESS MIX que contiene los elementos necesarios para realizar la reacción (ADN polimerasa, cebadores biotinilados, dNTP's, etc.). Se realizaron reacciones independientes utilizando 20 uL de reactivo con 5 uL del ADN. Las condiciones de amplificación se muestran en la **tabla 5**. Cada ensayo incluyó un control positivo interno (gen TST y plásmido con fragmento de VPH 61) y uno negativo (agua destilada).

Tabla 5. Condiciones de amplificación. Región L1 del genoma de VPH por medio de kit AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v3.0.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
1	50	2
	95	10
	95	0.5
50	50	0.5
	72	0.5
1	72	5
Mantener	10	Indefinido

Después se realizó un paso de desnaturalización, se tomaron las tirillas con unas pinzas y se rotularon sobre la línea de marca con lápiz. Una vez rotuladas, se colocaron sobre una canaleta de la bandeja de tirillas con la línea de marca boca arriba. Se añadieron 20 uL de solución desnaturalizante en la orilla de cada canaleta, posteriormente, se añadieron 10 uL de producto de PCR sobre la gota de solución desnaturalizante y se mezclaron por pipeteo, finalmente se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente se realizó el paso de hibridación, primero se añadieron 2 mL de solución HYB-1 precalentado a 42 °C a cada canaleta, después se colocó la bandeja en un baño de agua con agitador a 42 °C, y se incubó por 60 min a 80 rpm.

Para la revelación de resultados, una vez terminada la incubación, se retiró la solución de hibridación de cada canaleta mediante aspiración y se añadieron 2 mL de solución con diluida, después se colocó la bandeja en baño de agua con agitador a 42 °C por 15 min agitando suavemente. Seguido de la incubación, se removió el líquido por aspiración y se lavó con 2 mL de solución rin agitando por 2 min a temperatura ambiente. Se aspiró la canaleta y se colocaron 2 mL de solución nbt/bcip, y se incubó en la oscuridad por 8 min. Después, se retiró el líquido y se añadieron 2 mL de solución STOP y se incubó por 2 min. Para finalizar se removieron las tirillas y se dejaron secar por completo entre dos toallas de papel.

Para la interpretación de resultados se verificó que las bandas de control estuvieran presentes (control de amplificación, VPH universal y control de tinción), si alguna banda de control estaba ausente se invalidó la tirilla. Si la banda de VPH universal estaba presente, la muestra se consideraba positiva para VPH, si una o más bandas de genotipo estaban presentes, la muestra presentaba esos genotipos, si no se encontró ninguna banda de genotipo, pero la banda VPH universal estaba presente, se consideraba solo la presencia de VPH en la muestra ya que no se pudo determinar el genotipo. La figura 2 muestra el patrón de bandas para interpretación del genotipo.

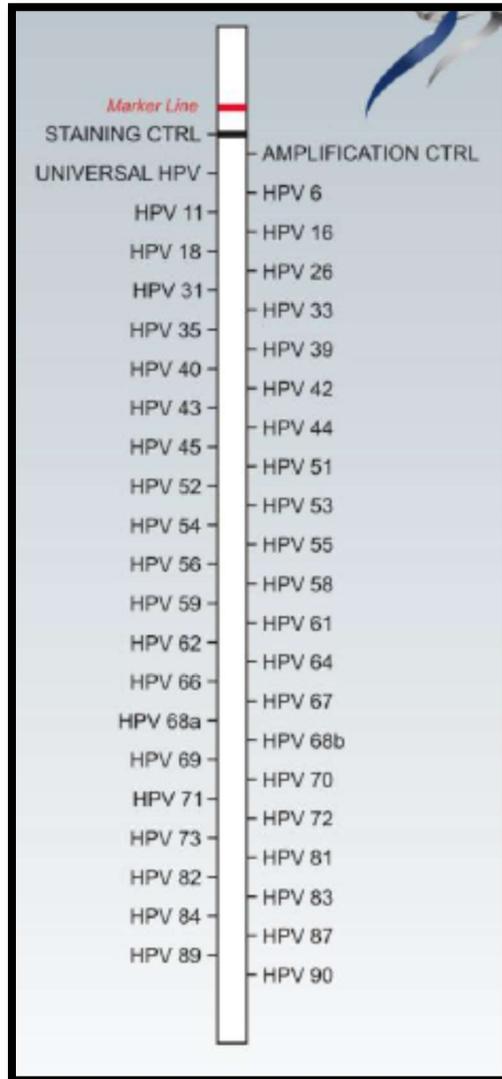


Figura 2. Patrón de bandas para determinar genotipo. Se utilizó el kit AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v3.0.

6.5. Detección del VEB y PVCM

La detección del VEB y PVCM se llevó a cabo por medio de reacciones independientes de qPCR utilizando el kit GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, WI, EUA) y cebadores específicos. Para la detección del VEB se amplificó un fragmento de la región LMP2 (NCBI, GenBank – No. Acceso: V01555) del genoma del virus empleando cebadores que fueron diseñados con base en un ensayo publicado por Ryan y colaboradores en 2004. Los oligonucleótidos seleccionados amplifican una región de 69 pb de longitud, sus secuencias se encuentran en la **Tabla 6**. En el caso de PVCM, se

utilizaron cebadores que amplificaron a la región VP1 (NCBI – No. Acceso: EU375803.1) del genoma del virus, generando un amplicón de 92 pb (**Tabla 6**). La estandarización de las reacciones se llevó a cabo por medio de un bloque de ADN sintético (gBlock Gene Fragment, IDT– Integrated DNA Technologies, California, US) que contiene los amplicones LMP2 del VEB y VP1 del PVCMM. Se realizaron diluciones seriadas del bloque sintético para generar una curva de calibración y se evaluaron también los límites de detección y la eficiencia de la reacción.

Tabla 6. Oligonucleótidos dirigidos a la región LMP2 del VEB y VP1 de PVCMM.

Amplicon	Nombre	Secuencias de oligonucleótidos
VEB 69 pb	OligoF	5'-AGC TGT AAC TGT GGT TTC CAT GAC-3'
	Sonda	6FAM5'-CTG CTG CTA CTG GCT TTC GTC CTC TGG-3' TAMRA
	OligoR	5'-GCC CCC TGG CGA AGA G-3'
PVCMM 92 pb	OligoF	5'-TAC AAG CAC TCC ACC AAA GC-3'
	Sonda	6FAM5'-ACA ACA GAG AAA CTC CTG TTC CTA CT -3' TAMRA
	OligoR	5'-CAG CAT GGC TAA GAT AAT CAG AAAC-3'

6.6. Análisis estadístico.

Los análisis descriptivos fueron realizados empleando frecuencias absolutas y porcentajes para el caso de variables cualitativas y medianas y rangos para las variables cuantitativas. Se realizó una comparación de poblaciones utilizando la χ^2 de Pearson o la prueba exacta de Fisher para muestras independientes cualitativas y la prueba U de Mann-Whitney para comparación de rangos de muestras independientes cuantitativas. Para determinar la significancia estadística se consideró un valor de p menor a 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (Version 25, SPSS. Inc., Chicago, E.U.A.).

7. RESULTADOS

7.1. Características Clínico-Epidemiológicas del grupo de estudio

Se conjuntó un grupo inicial de 60 especímenes provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de cáncer de cavidad oral y orofaringe (CaCOyO) del período de agosto 2017-agosto 2020. Se excluyeron todas aquellas con insuficiente cantidad de tejido tumoral o baja calidad en la extracción de ADN al no amplificar los controles internos (control de extracción gen TST humano) del kit para detección de VPH. Finalmente, el grupo de estudio se conformó por 41 muestras. La mediana de edad encontrada fue de 62 años, con un rango de 38 a 91 años, y el 70.7% de los pacientes eran del sexo masculino. El principal sitio de tumor fue la cavidad oral (78.1%) y la lengua fue el subsitio anatómico donde se encontró la mayor cantidad de incidencias (61.0%). El carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado fue el diagnóstico histopatológico más frecuente (73.2%). Los estadios tumorales avanzados (III y IV) fueron los más comunes (34.1% y 43.9% respectivamente). El 53.7% de los pacientes afirmó consumir tabaco y el 70.7% alcohol. La **Tabla 7** resume las características clínico-epidemiológicas de los pacientes incluidos.

Tabla 7. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y detección de VPH y VEB

	Total (n = 41)	Virus del Papiloma Humano			Virus de Epstein-Barr		
		Positivo (n= 14)	Negativo (n=27)	<i>p</i>	Positivo (n= 6)	Negativo (n= 35)	<i>p</i>
Edad (años)	62 [38-91]	52 [38-87]	66 [38-91]	0.058	71.5 [62-91]	60 [38-82]	0.026
≥60 años	25 (60.9%)	6 (24.0%)	19 (76.0%)		6 (24.0%)	19 (76.0%)	
Sexo				0.517			0.245
Masculino	29 (70.7%)	9 (31.0%)	20 (69.0%)		3 (10.3%)	26 (89.7%)	
Femenino	12 (29.3%)	5 (41.7%)	7 (58.3%)		3 (25.0%)	9 (75.0%)	
Sitio de tumor				0.954			0.484
Cavidad oral	32 (78.1%)	11 (34.4%)	21 (65.6%)		4 (12.5%)	28 (87.5%)	
Orofaringe	9 (21.9%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)		2 (22.2%)	7 (77.8%)	
Subsitio anatómico				0.139			0.602
Lengua	25 (61.0%)	12 (48.0%)	13 (52.0%)		5 (20.0%)	20 (80.0%)	
Paladar	3 (7.3%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)		1 (33.3%)	2 (66.7%)	
Encías	5 (12.2%)	0 (0.0%)	5 (100.0%)		0 (0.0%)	5 (100.0%)	
Amígdalas	4 (9.8%)	1 (25.0%)	3 (75.0%)		0 (0.0%)	4 (100.0%)	
Piso de boca	3 (7.3%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)		0 (0.0%)	3 (100.0%)	
Mucosa bucal	1 (2.4%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)		0 (0.0%)	1 (100.0%)	
Tipo de resección				0.923			0.572
Completa	18 (43.9%)	6 (33.3%)	12 (66.7%)		2 (11.1%)	16 (88.9%)	
Parcial	23 (56.1%)	8 (34.8%)	15 (65.2%)		4 (17.4%)	19 (82.6%)	
Diagnóstico histopatológico				0.168			0.213
CEMD	30 (73.2%)	10 (33.3%)	20 (66.7%)		5 (16.7%)	25 (83.3%)	
CEBD	5 (12.2%)	1 (20.0%)	4 (80.0%)		0 (0.0%)	5 (100.0%)	
CEPD	3 (7.3%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)		0 (0.0%)	3 (100.0%)	
CEBDQ	1 (2.4%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (100.0%)	
CEIS	1 (2.4%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)		1 (100.0%)	0 (0.0%)	
AS	1 (2.4%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (100.0%)	
Evolución (meses)	5 [1-24]	5.5 [1-24]	6 [1-24]	0.740	5 [1-24]	5 [1-24]	0.926
Estadío tumoral (TNM)^a				0.587			0.614
I	2 (4.9%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)		0 (0.0%)	2 (100.0%)	
II	7 (17.1%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)		1 (14.3%)	6 (85.7%)	
III	14 (34.1%)	6 (42.9%)	8 (57.1%)		1 (7.1%)	13 (92.9%)	
IV	18 (43.9%)	6 (33.3%)	12 (66.7%)		4 (22.2%)	14 (77.8%)	
Consumo de tabaco	22 (53.7%)	4 (18.2%)	18 (81.8%)	0.020	4 (18.2%)	18 (81.8%)	0.489
Consumo de alcohol	29 (70.7%)	9 (31.0%)	20 (69.0%)	0.517	3 (10.3%)	26 (89.7%)	0.245

Los valores se muestran en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad y la evolución se presentan como mediana [rango].

^aDe acuerdo a la 8ª edición de la guía de la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC) TNM.

CEMD, carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado; CEBD, carcinoma epidermoide bien diferenciado; CEPD, carcinoma epidermoide poco diferenciado; CEBDQ, carcinoma epidermoide bien diferenciado queratinizante; CEIS, carcinoma epidermoide in situ; AS, angiosarcoma.

7.2. Detección y genotipificación del VPH en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe.

Se evaluó la presencia del VPH en 41 muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe de los cuales, el virus fue detectado en 14 (34.1%). La mediana de edad en años de los pacientes positivos para el VPH fue de 52 [38-87] y de éstos, 6 (24.0 %) eran mayores de 60 años. Un total de 9 pacientes positivos (31%) son del sexo masculino. La presencia de VPH fue detectada en mayor proporción en pacientes con cáncer de cavidad oral, con 11 casos (34.4 %). La lengua fue el subsitio anatómico más común de los positivos con 12 frecuencias (48%). El tipo de resección más utilizada en estos pacientes fue la parcial y el diagnóstico histopatológico con mayor número de casos positivos fue el cáncer epidermoide moderadamente diferenciado, los estadios avanzados fueron en los que se detectó con mayor frecuencia la presencia del VPH, 9 pacientes (31.0 %) afirmaron consumir alcohol y 4 tabaco (18.2 %), se encontró una diferencia significativa entre el consumo de tabaco y la presencia de VPH ($p=0.020$). No se encontró diferencia significativa entre la presencia del VPH y las otras características clínico-epidemiológicas del paciente ($p < 0.05$).

Todos los especímenes positivos para VPH presentaron al menos un genotipo de VPH-AR. El VPH-16 fue el genotipo más frecuente con 13 casos (92.8 %). De estos, 7 (53.8 %) se presentaron como mono infección y los 6 (46.2%) restantes en coinfección con otros genotipos. El genotipo 18 fue el segundo más encontrado con 5 casos (35.7%), 4 (80 %) en coinfección y 1 (20 %) como único agente infeccioso. El genotipo 33 fue encontrado en 1 caso (7.1%). Por otra parte, el único VPH-BR encontrado fue el VPH-11, teniendo 2 casos (14.3%) en nuestro grupo de estudio. El paciente No. 15 tuvo infección por 3 genotipos de VPH (11, 16 y 18), los pacientes 9, 11, 13, 14 y 42 presentaron 2 genotipos, 4 con coinfección por 2 VPH-AR (16 y 18 o 16 y 33) y 1 con coinfección de 1 VPH-AR y 1 VPH-BR (11 y 16). En la **Tabla 8** se resumen las características de los pacientes con infección por VPH.

Tabla 8. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes positivos a VPH.

Paciente	09	10	11	13	14	15	19	20	21	29	31	33	34	38
Edad	60	75	50	46	70	38	62	66	41	53	42	51	51	87
Sexo	M	F	F	F	M	M	M	M	M	M	F	M	F	M
Sitio del tumor	Orofaringe	Cavidad oral	Orofaringe	Cavidad oral	Orofaringe									
Subsitio	Base de lengua	Borde lengua	Paladar duro	Amígdala	Borde lengua	Base de lengua								
Resección	Parcial	Completa	Parcial	Completa	Completa	Completa	Parcial	Parcial	Completa	Parcial	Parcial	Parcial	Completa	Parcial
Diagnóstico histopatológico	CEMD	CEMD	CEBD	CEMD	CEMD	CEBD	CEMD	CEMD	CEMD	CEMD	AS	CEMD	CEMD	CEIS
Tiempo de evolución (meses)	1	12	8	6	4	5	6	1	5	6	3	2	7	24
Antecedente de infección por VPH	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Estadio tumoral (T)	1	2	2	2	1	1	4	4	3	4	3	4	2	4
Estadio tumoral (N)	2	1	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	2
Estadio tumoral (M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grado Tumoral^a	IV	III	III	II	I	III	IV	IV	III	IV	III	IV	III	IV
Tabaquismo	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Etilismo	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Detección de VPH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Genotipo de VPH	11 y 16	16	16 y 18	16 y 18	16 y 18	11, 16 y 18	16	16	16	18	16 y 33	16	16	16

^aDe acuerdo a la 8ª edición de la guía de la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC) TNM

CEMD, carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado; CEBD, carcinoma epidermoide bien diferenciado; CEBDQ, carcinoma epidermoide bien diferenciado queratinizante; CEIS, carcinoma epidermoide in situ; AS, angiosarcoma.

7.3. Detección del VEB en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaríngeo.

Se detectó el genoma del VEB en 6 de 41 pacientes (14.6%) con diagnóstico clínico de CaCOyO. Todos los pacientes positivos para VEB eran mayores de 60 años, con una mediana de 71.5 años [62-91]. 3 pacientes (10.3%) afirmaron consumir alcohol y 4 pacientes (18.2%) consumían tabaco. Los tumores de cavidad oral fueron en los que más se detectó el VEB en 4 pacientes (12.5%), el subsitio tumoral más frecuente fue la lengua con 5 casos (20.0%), el estadio tumoral IV se encontró en 4 especímenes (22.2%), la resección parcial fue la más utilizada en 4 pacientes (17.4%) y el diagnóstico histopatológico más común con 5 casos (16.7%) fue el carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Se encontró diferencia significativa entre la edad del paciente y la detección de VEB ($p= 0.026$). No se encontró diferencia significativa entre la presencia del VEB y las otras características clínico-epidemiológicas del paciente ($p < 0.05$). En la **Tabla 9** se muestran las características de los pacientes con infección por VEB.

Tabla 9. Características clínico-epidemiológicas de pacientes positivos a VEB.

Paciente	01	02	07	18	36	38
Edad	65	70	62	91	73	87
Sexo	F	M	F	F	M	M
Sitio del tumor	Cavidad oral	Cavidad oral	Cavidad oral	Cavidad oral	Orofaringe	Orofaringe
Subsitio	Borde lengua	Borde lengua	Borde lengua	Borde lengua	Paladar blando	Base de lengua
Resección	Completa	Completa	Parcial	Parcial	Parcial	Parcial
Diagnóstico histopatológico	CEMD	CEMD	CEMD	CEMD	CEMD	CEIS
Tiempo de evolución (meses)	2	7	8	1	3	24
Antecedente de infección por VPH	No	No	No	No	No	No
Estadio tumoral (T)	3	3	3	2	4	4
Estadio tumoral (N)	2	0	2	0	2	2
Estadio tumoral (M)	0	0	0	0	0	0
Grado Tumoral ^a	IV	III	IV	II	IV	IV
Tabaquismo	-	+	-	+	+	+
Etilismo	-	+	+	-	-	+
Detección de VPH	-	-	-	-	-	+
Genotipo de VPH	-	-	-	-	-	16
Detección de VEB	+	+	+	+	+	+
Coinfección	-	-	-	-	-	+

^aDe acuerdo a la 8ª edición de la guía de la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC) TNM, CEMD, carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado; CEIS, carcinoma epidermoide in situ]

Se detectó la coinfección por VPH y VEB en un solo paciente, se trata de un masculino de 87 años con tumor de orofaringe situado en la base de la lengua con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide *in situ* grado IV. El genotipo 16 del VPH fue encontrado en este paciente.

7.4. Detección del PVCM en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer oral y orofaringe.

Se determinó la presencia de material genético del PVCM mediante reacciones de qPCR en 41 pacientes con diagnóstico de CaCOyO. Se observó una prevalencia del 0% de PVCM en este grupo de estudio.

8. DISCUSIÓN

Los tumores de cavidad oral y orofaringe son heterogéneos, más del 90 % de estos son carcinoma de células escamosas, estos tumores se han asociado a diferentes causas las cuales pueden ser por hábitos del paciente como el abuso en el consumo de tabaco o alcohol, también se ha descrito la etiología viral como una de las principales causas de estos tumores, la cantidad de pacientes jóvenes sin antecedentes de consumo de tabaco o alcohol que desarrollan estos tipos de cáncer ha ido en aumento y se ha propuesto que la infección por virus oncogénicos puede ser la causa de este aumento en la incidencia, en el presente estudio se determinó la prevalencia de infecciones por VPH, VEB y PVMC, así como sus coinfecciones en pacientes con tumores de cavidad oral y orofaringe (Fakhry *et al.* 2019).

El grupo de estudio se conformó por 41 especímenes de pacientes con diagnóstico de CaCOyO recolectadas del banco de tumores de la UMAE No. 25 del IMSS, en este grupo se encontró una mediana de edad de 62 años con un 60.9% de pacientes con edad mayor o igual a 60, la mayoría de nuestros pacientes eran de sexo masculino, la cavidad oral fue el sitio de mayor recurrencia tumoral y el subsitio fue la lengua. Estos resultados concuerdan con diversos estudios a nivel mundial que reportan una mayor incidencia de este tipo de tumores en pacientes masculinos, mayores de 60 años, así como la cavidad oral y la lengua como los sitios con mayor incidencia (Villagómez-Ortíz *et al.* 2016; Mohebbi *et al.* 2018; Valls-Ontañón *et al.* 2019, Tagliabue *et al.* 2020).

El desarrollo de tumores de cavidad oral y orofaringe está altamente relacionado con el uso de tabaco y alcohol en exceso, esto debido a la inflamación crónica asociada al uso de estos productos, por esta razón se ha observado que este tipo de tumores se presenta en mayor medida en personas de edad avanzada, en este estudio se encontró que el 53.7% consumían tabaco y el 70.7% alcohol y la mediana de edad fue de 62 años concordando con estudios previos (You *et al.* 2019; Fakhry *et al.* 2019; Tagliabue *et al.* 2020) los estadios tumorales avanzados fueron los encontrados más comúnmente y esto se puede deber al estatus socioeconómico de los pacientes y a la falta de información sobre este tipo de padecimientos.

La infección por VPH se considera como un factor de riesgo en los tumores de orofaringe, se ha encontrado también en cavidad oral y laringe, en nuestro estudio se encontró una prevalencia de infección por VPH en nuestra población de 34.1%, Kreimer y colaboradores reportaron en un meta análisis una prevalencia del 26% de positividad de VPH en el mundo lo que contrasta con nuestros resultados, Bloomberg y colaboradores reportaron en la población danesa incidencias del 15.3% para hombres y 16.4% para mujeres, por su parte Valls-Ontañón y colaboradores encontraron incidencias del 12.3% en cavidad oral y 25.8% en orofaringe, Termine y colaboradores encontraron una prevalencia del 34.5% de VPH, en el caso de Broccolo y colaboradores se encontraron con una prevalencia del 25% para cáncer de orofaringe y 0% en cáncer de cavidad oral.(Kreimer *et al.* 2005; Bloomberg *et al.* 2011; Valls-Ontañón *et al.* 2019; Termine *et al.* 2008; Broccolo *et al.* 2018). Aunque no hay una diferencia significativa entre la edad y la incidencia de este tipo de tumores en nuestro estudio, se puede observar que hay una mayor cantidad de pacientes menores de 60 años positivos a VPH, esta ligera tendencia concuerda con estudios que mencionan el aumento en casos de tumores de cabeza y cuello en personas jóvenes con estatus de infección positiva a VPH (You *et al.* 2019; Fakhry *et al.* 2019).

Los genotipos de alto riesgo se encontraron en mayor cantidad en nuestra población siendo los genotipos 16 y 18 los más prevalentes, esto concuerda con la literatura que menciona a los arVPH como los más encontrados en carcinomas de orofaringe y cavidad oral, así como los genotipos 16 y 18 como los más comunes en este tipo de padecimientos (Broccolo *et al.* 2018; Villagómez-Ortíz *et al.* 2016; Rapado-González *et al.* 2020; Valls-Ontañón *et al.* 2019; Tagliabue *et al.* 2020). La prevalencia de infección por VPH dependiendo del sitio anatómico fue de 34.4% para cavidad oral vs 33.3% para orofaringe, esto contrasta con la literatura reportada en donde se ha encontrado mayor prevalencia en los tumores de orofaringe (Bloomberg *et al.* 2011; Broccolo *et al.* 2018; Tagliabue *et al.* 2020; Rapado-González *et al.* 2020).

El VEB se ha asociado a diferentes neoplasias, en el área de la cabeza y cuello se ha asociado al carcinoma nasofaríngeo, su rol en los carcinomas de orofaringe y cavidad oral no ha sido estudiado a profundidad, en este estudio se encontraron prevalencias de 12.5%

para cavidad oral y 22.2% para orofaringe, estas bajas prevalencias difieren de las reportadas por Broccolo y colaboradores quienes reportan un 45% para orofaringe y 72.7% para cavidad oral, un estudio reportado por Deng y colaboradores reportó prevalencias de 79.7% para orofaringe y 59.5% para cavidad oral, esto puede deberse a las técnicas utilizadas para la detección del VEB, los autores utilizaron hibridación *in situ* para determinar la cantidad de ARN de la proteína EBER presente en la muestra (Broccolo *et al.* 2018, Deng *et al.* 2014), un estudio realizado por Goldenberg y colaboradores reportó una prevalencia del 25% en tumores de cabeza y cuello, de los cuales la mayoría se encontraba en cavidad oral y orofaringe, estas muestras fueron evaluadas por qPCR (Goldenberg *et al.* 2004). Todos los pacientes positivos a VEB eran mayores de 60 años con una mediana de edad de 71.5 años, esto contrasta con lo reportado por Broccolo y colaboradores (media 65años) y Mulder y colaboradores (mediana 48 años) (Broccolo *et al.* 2018; Mulder *et al.* 2021).

La coinfección por VPH y VEB fue detectada solo en 1 paciente, esto representa el 11% de los tumores de orofaringe en nuestro estudio, esto concuerda con lo reportado por Broccolo y colaboradores, ellos encontraron un 10% de coinfección en tumores de orofaringe y ninguna coinfección en cavidad oral, un estudio realizado por Jiang y colaboradores reporta una prevalencia de coinfección por VPH y VEB del 70% en tumores de base de lengua y un 25% en tumores de amígdalas, Al-Thawadi y colaboradores encontraron un 34.7% de coinfección en muestras de CCE de diversos sitios anatómicos, (Broccolo *et al.* 2018; Jiang *et al.* 2015; Al-Thawadi *et al.*2020).

La presencia de PVCM no fue detectada en las muestras evaluadas, esto difiere con la literatura que reporta la presencia de este virus en muestras de cavidad oral y orofaringe en 6 a 16% (Muñoz *et al.* 2020; Mohebbi *et al.* 2018; Hamiter *et al.* 2017). Mulder y colaboradores reportaron que no se detectó la presencia de PVCM en muestras de tumores de cabeza y cuello y esto fue atribuido a la diferencia de sensibilidades de los métodos de detección utilizados (Mulder *et al.* 2021). En el presente estudio solo se utilizó el método de qPCR para la detección de este virus, en algunos estudios utilizan este método y lo complementan con hibridación *in situ* de ARN o inmunohistoquímica del antígeno LT,

pero en la mayoría de los casos se basan solo en la amplificación de la región VP1 o LT3. Además, en la gran mayoría de los casos positivos la cantidad de copias detectadas son muy bajas.

9. CONCLUSIONES

- La prevalencia de infecciones por VPH en pacientes con tumores de cavidad oral y orofaringe en este estudio fue similar a la reportada en otros lugares del mundo.
- La prevalencia de infecciones por los VPH-AR 16 y 18 es similar a lo reportado en la literatura.
- Se observó una ligera tendencia a desarrollar estos tumores en pacientes de menor edad infectados por VPH-AR, en comparación con los que son VPH negativos.
- Las coinfecciones por VPH y VEB son bajas en nuestra muestra de estudio.

10. PERSPECTIVAS

- Se necesita realizar un estudio con mayor cantidad de muestras para poder asociar las coinfecciones por estos virus y el riesgo de padecer tumores de cavidad oral y orofaringe.
- Es necesario revisar otros marcadores biológicos para determinar si los virus o sus coinfecciones son los responsables del desarrollo tumoral.
- Se podrían incluir muestras de tejido no tumoral para establecer las diferencias en las infecciones por estos virus en tejido sano y tumoral.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed MM, Cushman CH, Decaprio JA. 2022. Merkel cell polyomavirus: Oncogenesis in a stable genome. *Viruses*. 14:1–14.
2. Al-Hebshi NN, Borgnakke WS, Johnson NW. 2019. The Microbiome of Oral Squamous Cell Carcinomas: a Functional Perspective. *Current Oral Health Reports*.;6:145–160.
3. Al-Thawadi H, Gupta I, Jabeen A, Skenderi F, Aboukassim T, Yasmeeen A, et al. 2020. Co-presence of human papillomaviruses and Epstein-Barr virus is linked with advanced tumor stage: A tissue microarray study in head and neck cancer patients. *Cancer Cell International* [Internet].;20:1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01348-y>
4. Aupérin A. 2020. Epidemiology of head and neck cancers: An update. *Current Opinion in Oncology*.;32:178–186.
5. Ayee R, Ofori MEO, Wright E, Quaye O. 2020. Epstein Barr virus associated lymphomas and epithelia cancers in humans. *Journal of Cancer*.;11:1737–50.
6. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. 2011 Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978–2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *International Journal of Cancer* [Internet].;129:733–41. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.25699>
7. Broccolo F, Ciccicarese G, Rossi A, Anselmi L, Drago F, Toniolo A. 2018 Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in keratinizing versus non-keratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Infectious Agents and Cancer*.;13:1–5.
8. Chow LQM. 2020. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 382:60–72. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1715715>.
9. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. 2018. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*.;47:2–13.

10. Deng Z, Uehara T, Maeda H, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, et al. 2014. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and genotype distribution in head and neck cancers. *PLoS One*.;9:1–11.
11. Dhull AK, Atri R, Dhankhar R, Chauhan AK, Kaushal V. 2018. Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. *World Journal of Oncology*.;9:80–84.
12. Ettinger KS, Ganry L, Fernandes RP. 2019. Oral Cavity Cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*.; 31:13–29. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.08.002>.
13. Fakhry C, Blackford AL, Neuner G, Xiao W, Jiang B, Agrawal A, et al. 2019. Association of Oral Human Papillomavirus DNA Persistence with Cancer Progression after Primary Treatment for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncology*.;5:985–92.
14. Faria S de O, Nascimento MC do, Kulcsar MAV. 2020. Malignant neoplasms of the oral cavity and oropharynx treated in Brazil: what do hospital cancer records reveal? *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.05.019>.
15. Farrel P. 2019. Epstein-Barr virus and cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 14: 29-53.
16. Farrell PJ. 2019. Epstein–Barr Virus and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [Internet]. 14:29–53. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>.
17. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, et al. 2004. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*.;114:1027–31.
18. Guzmán PG, Villaseca MH, Antonio LP, Araya JO, Aravena PM, Cravero CP, et al. 2011. Carcinoma epidermoide oral y orofaríngeo. Estudio clínico-patológico. *Revista Chilena de cirugía*.;63:250–256.
19. Hamiter M, Asarkar A, Rogers D, Moore-Medlin T, McClure G, Ma X, et al. 2017. A pilot study of Merkel cell polyomavirus in squamous cell carcinoma of the

- tongue. *Oral Oncology*. 74:111–114. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.09.021>.
20. Irimie AI, Sonea L, Jurj A, Mehterov N, Zimta AA, Budisan L, et al. 2017. Future trends and emerging issues for nanodelivery systems in oral and oropharyngeal cancer. *International Journal of Nanomedicine*.12:4593–606.
 21. Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X, et al. 2015 Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*.;44:28–36.
 22. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 6(1).
 23. Kato MG, Baek C-H, Chaturvedi P, Gallagher R, Kowalski LP, Leemans CR, et al. 2020. Update on oral and oropharyngeal cancer staging – International perspectives. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*.;6:66–75.
 24. Ketabat F, Pundir M, Mohabatpour F, Lobanova L, Koutsopoulos S, Hadjiiski L, et al. 2019. Controlled drug delivery systems for oral cancer treatment—current status and future perspectives. *Pharmaceutics*.11(7).
 25. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. 2005 Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* [Internet]. ; 14:467–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
 26. Lin A. 2018. Radiation Therapy for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Dental Clinics of North America* [Internet]. 62:99–109. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.007>.
 27. Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V. 2020. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 31:1462–1475. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>.

28. Miriam B, Melissa D, Lilo G, Laura S-M, M. PM, Rachel S, et al. 2019. Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology* [Internet]. 5;93(6): e02004-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.02004-18>.
29. Mohebbi E, Noormohamadi Z, Sadeghi-Rad H, Sadeghi F, Yahyapour Y, Vaziri F, et al. 2018 Low viral load of Merkel cell polyomavirus in Iranian patients with head and neck squamous cell carcinoma: Is it clinically important? *Journal of Medical Virology*.;90:344–50.
30. Moro J da S, Maroneze MC, Ardenghi TM, Barin LM, Danesi CC. 2018. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. *Einstein*; 16:1-5
31. Mulder FJ, Klufah F, Janssen FME, Farshadpour F, Willems SM, de Bree R, et al 2021. Presence of Human Papillomavirus and Epstein–Barr Virus, but Absence of Merkel Cell Polyomavirus, in Head and Neck Cancer of Non-Smokers and Non-Drinkers. *Frontiers in Oncology*.;10:1–12.
32. Muñoz JP, Blanco R, Osorio JC, Oliva C, Diaz MJ, Carrillo-Beltrán D, et al. 2020 Merkel cell polyomavirus detected in head and neck carcinomas from Chile. *Infectious Agents and Cancer*.;15:1–5.
33. Münz C. 2019. Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nature Reviews Microbiology*.;17:691–700.
34. Pezdirec M, Strojjan P, Boltezar IH. 2019. Swallowing disorders after treatment for head and neck cancer. *Radiology and Oncology*. 53:225–30.
35. Rapado-González Ó, Martínez-Reglero C, Salgado-Barreira Á, Rodríguez-Fernández A, Aguin-Losada S, León-Mateos L, et al. 2020 Association of salivary human papillomavirus infection and oral and oropharyngeal cancer: A meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*.;9:1–19.
36. Ryan JL, Fan H, Glaser SL, Schichman SA, Raab-Traub N, Gulley ML. 2004. Epstein-Barr Virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: A novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *Journal of Molecular Diagnostics* [Internet]. 6:378–85. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60535-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60535-1).
37. Speight PM, Farthing PM. 2018. The pathology of oral cancer. *British Dental Journal*; 225:841–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.926>.

38. Spurgeon ME, Cheng J, Ward-Shaw E, Dick FA, DeCaprio JA, Lambert PF. 2022. Merkel cell polyomavirus large T antigen binding to pRb promotes skin hyperplasia and tumor development. *PLOS Pathogens* [Internet].;18(5):e1010551. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010551>.
39. Spurgeon ME, Liem A, Buehler D, Cheng J, Decaprio JA, Lambert PF. 2021 The merkel cell polyomavirus t antigens function as tumor promoters in murine skin. *Cancers*.;13:1–19.
40. Tagliabue M, Mena M, Maffini F, Gheit T, Blasco BQ, Holzinger D, et al. 2020 Role of human papillomavirus infection in head and neck cancer in Italy: The HPV-AHEAD study. *Cancers*.;12:1–19.
41. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al 2008. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Annals of Oncology* [Internet].;19:1681–90. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419401877>
42. Tumban E. 2019. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 11(10).
43. Valls-Ontañón A, Hernández-Losa J, Somoza Lopez de Haro R, Bellosillo-Paricio B, Ramón y Cajal S, Bescós-Atín C, et al. 2019. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Medicina Clinica*.;152:174–180.
44. Villagómez-Ortíz VJ, Paz-Delgadillo DE, Marino-Martínez I, Ceseñas-Falcón LÁ, Sandoval-de la Fuente A, Reyes-Escobedo A. 2016 Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. *Cirugía y Cirujanos*.;84:363–8.
45. Vogel DWT, Vogel T, Zbaeren P, Thoeny HC. 2010. Cancer of the oral cavity and oropharynx. *Cancer Imaging*.;10:62–72.
46. Vonsky M, Shabaeva M, Runov A, Lebedeva N, Chowdhury S, Palefsky JM, et al. 2019. Carcinogenesis Associated with Human Papillomavirus Infection. Mechanisms and Potential for Immunotherapy. *Biochemistry*.84:782–799.

47. Wu JH, Narayanan D, Limmer AL, Simonette RA, Rady PL, Tying SK. 2019. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Induces DNA Damage Response. *Intervirology*.;62:96–100.
48. Yete S, D’Souza W, Saranath D. 2018. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*. 94:133–141.
49. You EL, Henry M, Zeitouni AG. 2019. Human papillomavirus–associated oropharyngeal cancer: Review of current evidence and management. *Current Oncology*. 26:119–123.
50. Zaroni DK, Patel SG, Shah JP. 2019. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Current Oncology Reports*.;21:52-59.