

Asociación de la carga viral y el estado físico de VPH-16 con la sobrevida de pacientes con Cáncer de Cabeza y Cuello.

Veitía Dayahindara, Liuzzi Juan, Ávila Maira, Rodriguez Idamelys, Toro Felix, Correnti María.

Dra. Veitía Dayahindara. Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Oncología y Hematología-MPPS

Dr. Liuzzi Juan. Servicio de Cabeza y Cuello. Hospital Oncológico “Padre Machado”-MPPS

Lic. Ávila Maira. Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Oncología Y Hematología-MPPS

Lic. Rodriguez Idamelys. Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Inmunología-UCV

Dr. Toro Felix. Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Inmunología-UCV

Dra. Correnti María. Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Oncología y Hematología-MPPS

Correspondencia: Dra. Dayahindara Veitía. Correo: dayah_20@hotmail.com

Resumen

Introducción: Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) son de origen multifactorial siendo el tabaco y el alcohol sus principales factores de riesgo. Actualmente se consideran otros factores asociados con la génesis de estos tumores, entre ellas infecciones virales, especialmente la infección por VPH. **Objetivo:** evaluar la infección por VPH, carga de E6-VPH-16 y estado físico del mismo en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, así como evaluar sus efectos en la sobrevida de estos pacientes. **Metodología:** Se evaluaron 80 biopsias frescas de CCC. El material genético se extrajo empleando el estuche comercial QIAGEN. La detección y tipificación de VPH se realizó mediante INNO-LiPA, mientras que la cuantificación y el análisis de la integración del genoma viral a la célula hospedera fue realizado mediante qRT-PCR. **Resultados:** La edad promedio de los pacientes incluidos fue de $60,34 \pm 14,48$ años, con predominancia del género masculino. La infección por VPH más frecuente fue por el genotipo 16 (52,8%), con un promedio de 10 copias del gen E6-VPH-16/ β -globina; por otro lado la integración del genoma viral a la célula hospedera se observó en el 86% de los casos con una relación estadísticamente significativa con la localización del tumor y la carga viral ($p < 0,05$). **Conclusiones:** La infección por VPH-16 se establece como la más frecuente, siendo el estado físico en el que se encuentre en la célula hospedera el factor determinante para poder establecer la respuesta al tratamiento. Sin embargo son necesarios más estudios para evidenciar el papel de la infección por VPH en la carcinogénesis.

Palabras Clave: Cabeza y cuello, VPH, Carga viral, integración, sobrevida

Introducción

Los tumores de cabeza y cuello como cualquier patología oncológica son de origen multifactorial siendo el tabaco y el alcohol sus principales factores de riesgo; se estima que entre 85 y 90% de los casos con Carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) son explicados por la exposición a estos factores siendo el riesgo proporcional a la intensidad de la exposición [1]. En las últimas décadas se han sugerido a las infecciones virales como factores de riesgo asociados al desarrollo de esta malignidad; se ha visto además que la presencia de virus oncogénicos y su interacción con el material genético del hospedero provoca la alteración en genes que intervienen en el control del ciclo celular de las células infectadas [2].

Actualmente, existen evidencias epidemiológicas y moleculares de que el Virus de Papiloma Humano (VPH) está relacionado con el cáncer de células escamosas, como lo es el caso del carcinoma cervical [3], y carcinoma orofaríngeo [4]. Esta infección probablemente adquirida por vía sexual podría alterar la epidemiología y demografía del cáncer de las vías aerodigestivas y en consecuencia, el diagnóstico de cáncer de células escamosas positivo para VPH pudiera ser clínicamente relevante con fines de pronóstico, además de tener futuras implicaciones diagnósticas y terapéuticas, incluyendo la prevención [5]. Numerosos estudios moleculares sugieren que los VPH de alto riesgo oncogénico especialmente los genotipos 16 y 18, están etiológicamente relacionados a un subconjunto de cánceres de cabeza y cuello, especialmente carcinoma de células escamosas de orofaríngeo, señalándose que la infección por VPH en la orofaríngeo

puede predisponer a la tumorigénesis [4;6;7;8]. Se ha podido determinar el estatus físico en el que se encuentra el VPH en las células hospederas mediante técnicas de amplificación como PCR en tiempo real, considerándose que está integrado cuando hay ruptura del gen E2, que se encuentra en forma episomal cuando hay un número de copias equivalente de los genes E2 y E6, y también se describe una forma mixta en la que hay menor número de copias del gen E2 que de E6 [9]. Esto es de gran importancia ya que se ha considerado que la integración del genoma viral al genoma celular es un paso importante a considerar en la transformación maligna; lo que lleva a la ruptura del gen E2 el cual controla la expresión de los genes E6 y E7, lo que resulta en un incremento de la expresión de dichos oncogenes. E6 se relaciona con la degradación de P53 y E7 con la degradación de la proteína de retinoblastoma (pRB) ambos importantes en el control del ciclo celular [6].

Motivado a todo lo expuesto anteriormente, esta investigación tiene como objetivo evaluar la infección por VPH, carga de E6-VPH-16 y estado físico del mismo en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, así como evaluar sus efectos en la sobrevida de estos pacientes.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Se evaluaron 80 biopsias frescas de tumores de CCECC, recolectadas por el Dr. Juan F. Liuzzi en el Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital Oncológico “Padre Machado”-Caracas.

Cada paciente incluido en este estudio debió expresar su aprobación mediante la firma de un consentimiento informado así como respondiendo a una encuesta que se encuentra enmarcada en los proyectos FONACIT G-2005000408, 2013000413 y Misión Ciencia LPL-20074001088.

Extracción del material genético

La extracción de ácidos nucleídos se realizó mediante el estuche comercial DNA mini kit QIAGEN (250) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

De cada biopsia se cortó una porción de aproximadamente 25 mg de tejido y este a su vez fue cortado en trozos pequeños e incubados en buffer ATL (180µl) y 20µl de proteinasa K durante toda la noche a 56°C en agitación. Posteriormente se agregaron 200µl de buffer AL, mezclando en vortex durante 15 seg. e incubado a 70°C durante 10 min.

Se añadió 200 µl de etanol absoluto, posteriormente se trasvasó a una columna y se centrifugó a 6000xg durante 1 min. Se añadió 500 µl de buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 6000xg durante 1 min; se añadió 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a 20.000xg durante 3 min. Posteriormente se añadieron 200 µl de buffer AE, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugó a 6000xg durante 1 min. El material genético recolectado fue guardado a -80°C hasta su uso posterior.

Detección y Tipificación del Virus de Papiloma Humano

La detección y tipificación del VPH se realizó empleando el estuche comercial INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics®- Blotechnology for Healthcare).

Este ensayo consistió en una hibridación reversa que está destinada para la identificación de 28 genotipos de VPH mediante la detección de secuencias específica de la región L1 del genoma de VPH, a través del empleo de iniciadores SPF10, los amplificadores biotinilados resultantes se desnaturalizaron y se hibridaron con sondas de oligonucleótidos específicas. Se utilizaron también iniciadores para la amplificación del gen humano HLA-DPB1 a fin de controlar la calidad de la muestra y la extracción del ADN. El revelado se realizó con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, la cual se unió a cualquier híbrido biotinilado formado con anterioridad.

Cuantificación y evaluación del estatus físico del genoma de VPH-16

La cuantificación de E6-VPH16 así como la evaluación de la integración del genoma se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando las especificaciones descritas por Koskinen y col. (2003)[9].

La PCR en tiempo real fue realizada con 7500 Real Time PCR System (Applied Biosistem) en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Inmunología-UCV. La secuencia de los iniciadores se pueden observar en la tabla 1. La amplificación y cuantificación de los genes E6 y E2 se realizó simultáneamente en tubos de reacción separados. La mezcla de reacción

consistió en 50µl conformada por 1X SSoFast Evagreen (BIORAD), 900nM de cada uno de los iniciadores, un aproximado de 50ng de ADN total. El proceso de amplificación constó de 1 ciclo a 95°C por 10 min, 44 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, anillamiento y extensión 60°C por 1 min, seguido de la curva de disociación.

En todas aquellas muestras que resultaron positivas para VPH genotipo 16 se evaluaron para verificar la ruptura del gen E2 así como la cuantificación para los genes E2 y E6 del VPH genotipo 16.

La curva patrón se realizó con ADN de células HeLa, se emplearon los iniciadores GP5+/GP6+ que permiten detectar el genoma de VPH así como los iniciadores PC04 y GH20 para amplificar el gen de β globina humana (descritos en la tabla 1). El ADN extraído fue cuantificado (Beckman Instruments DV series Spectrophotometer.260-280nm). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de este material que fue empleado para las respectivas qRT-PCR. Para VPH se emplearon 1,5µM de cada iniciador, 1X SsoFast Eva Green en un volumen final de 20µl. Para la amplificación y cuantificación del gen β-globina se utilizaron 1µM de los iniciadores PC04 y GH20, 2X SsoFast Evagreen para un volumen final de 50µl. El proceso de amplificación empleado fue 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C, una hibridación a 46°Cx 1 min y una extensión a 72° C durante 30 seg. Una vez realizado los procesos de amplificación tanto de la curva estándar como de la carga viral para los genes E6 y E2 se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,2 µl de solución al 1%) y expuestos a luz

UV para registro fotográfico en una cámara de visualización ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), corroborando que el proceso se ha llevado a cabo con éxito.

Análisis estadísticos

La relación entre la infección viral con el desarrollo de los tumores, se evaluó mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2), la significancia estadística fue considerada para valores de $p < 0,05$.

Para los análisis y estimación de las curvas de supervivencia de los pacientes se empleó el método de Kaplan Meier. La significancia estadística fue considerada para valores de $p < 0,05$.

Para ambos casos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics25

Resultados

El promedio de edad de los pacientes fue de $60,34 \pm 14,48$ años (rango 19-89). El género más frecuente fue el masculino con 68,75% ($p = 0,001$), en cuanto a los factores de riesgo asociados se obtuvo que el 73,5% ($p = 0,000$) de los pacientes eran fumadores y 70% consumidores de alcohol ($p = 0,000$). La localización más frecuente del tumor fue la cavidad oral (33,8%) seguido de la laringe (30%) y la orofaringe (22,5%), adicionalmente los senos paranasales (5%), nasofaringe (3,8%), hipofaringe (2,5%) y fosas nasales (2,5%) también se presentaron como localización del tumor primario (Tabla 2).

En cuanto a los análisis histopatológicos de los tumores, se obtuvo que el 40% correspondió a tumores extensos (T4), moderadamente diferenciados (43,75%), en estadios avanzados de la enfermedad (EIII y EIV).

El 66% de las muestras evaluadas resultó positiva para la infección por VPH ($p=0,004$), siendo la infección por VPH-16 la forma de infección única más frecuente (17%). Se pudo notar que la infección por este genotipo viral estuvo presente en forma de co infección o de infección mixta para un total de 52,8% de positividad para VPH-16 (Tabla 3).

En cuanto a la presencia de la infección según la localización anatómica del tumor primario se observó que la cavidad oral, la laringe y la orofaringe fueron las más frecuentes con 34%, 28% y 23% respectivamente; la mayoría de los tumores VPH-positivos se encontraban en estadios avanzados EIII (26%) y EIV (55%) (Tabla 3), de estos 60% eran pacientes fumadores y 58% consumidores de alcohol (datos no mostrados).

La carga viral promedio fue de 10 copias de ADN de VPH por cada copia de β -globina (rango entre 2 y 20 copias de ADN de VPH), siendo la orofaringe la localización anatómica con el mayor número de copias. En esta localización con elevado número de copias de E6-VPH16 el genoma viral se encontró de forma episomal o mixto. La Cavidad oral y la laringe, por el contrario presentaron bajo número de copias de E6-VPH16 y en éstas el ADN viral se encontró de forma integrada ($p=0,00$) (tabla 4). La frecuencia promedio de integración fue de 86%; se

observó una relación estadísticamente significativa entre la baja carga viral y la localización anatómica con la integración ($p=0,016$).

Posterior al seguimiento de los pacientes por un período de 120 meses se observó que hay una tendencia hacia la disminución de la sobrevida en pacientes masculinos, que incurrieran en alguna práctica de riesgo (alcohol y/o tabaco), y que fueron diagnosticados en estadios avanzado, adicionalmente se pudo notar que el estado físico del genoma viral en la célula hospedera juega un papel importante; en aquellos casos que presentaban el ADN viral de forma episomal presentaron una sobrevida constante mientras que aquellos pacientes que presentaban el ADN viral de forma integrada, aunque sin una relación estadísticamente significativa ($p>0,05$), (Figura 1 y 2).

Discusión

El CCECC se presenta principalmente en varones, siendo la edad de aparición un factor importante [10; 11]; en la presente investigación el promedio de edad se mantuvo dentro del rango descrito, con $60,34\pm 14.48$ años (rango 19-89), de acuerdo con reportes previos este tipo de malignidad se presenta en mayor frecuencia entre la quinta y séptima década de vida, con una media de 62 ± 12 años [12].

El 66% de las muestras evaluadas resultaron positivas para la presencia del genoma de VPH, este valor es superior a los reportados por otros trabajos donde se señalan promedios de detección viral de 39%-40% [13;14], 60% según Yang et al (2019) [15] hasta 61% según Koskinen et al (2003) [9], sin embargo se

encuentra dentro del promedio reportado por otros autores [16;17]. Con respecto al genotipo; el VPH-16 fue el más frecuente en forma de infección única (17%), notándose que la infección por este genotipo ya sea en forma de co-infección o de infección mixta abarca un número considerable de los casos analizados, esto se encuentra dentro de los rangos descritos por Koskinen et al (2003) y Tao et al. (2018) [9;18], quienes reportan 27% y 85% de positividad para VPH respectivamente. Otro aspecto importante que se pudo notar fue que en las etapas iniciales de la enfermedad la frecuencia de infección por VPH es baja (4%) y que ésta va incrementando a medida que se avanza en estadio (55% en estadios avanzados), lo cual apoya afirmaciones realizadas en otras localizaciones anatómicas como cuello uterino por ejemplo, en las que se indica que una infección persistente con genotipos de alto riesgo oncogénico, entre ellos VPH-16, es un factor de riesgo importante para la génesis y progresión tumoral [19]. Adicionalmente el 60% de los pacientes VPH incurrieron en otras prácticas de riesgo como alcohol y tabaco sugiriendo que estos pueden actuar también como factores de riesgo para la infección por VPH y que todos ellos en conjunto (alcohol, tabaco, VPH y otras infecciones) podrían actuar de forma sinérgica en el proceso de desarrollo y progresión de la malignidad.

La cavidad oral, la laringe y la orofaringe fueron en este orden las localizaciones anatómicas más frecuentemente infectadas por VPH, lo que es contrario a publicaciones donde se describe a la orofaringe como el área de cabeza y cuello con mayor índice de infección [13], sin embargo los resultados de diversas investigaciones concuerdan en el hecho de que estas tres localizaciones son las infectadas con mayor frecuencia por VPH; por otro lado se sugiere que el

hecho de que la cavidad oral es “la puerta de entrada del virus”, esto podría coincidir con una elevada frecuencia de infección viral; además se sugiere que las infecciones por VPH son un factor biológico que juega un papel importante en la carcinogénesis de estas localizaciones anatómicas, basados en evidencias epidemiológicas y clínico-patológicas [20]; siendo el VPH 16 identificado entre un 29% y 90% de las mismas [21; 22; 23; 24] y se propone además que la presencia de este genotipo viral en células exfoliadas de la cavidad oral incrementa 14 veces el riesgo de cáncer de orofaringe [25].

Por otro lado, los resultados de carga viral promedio de esta investigación concuerdan con trabajos previos en los que se describe que para este tipo de tumores es variable y que puede encontrarse entre 3.4×10^{-4} hasta valores tan altos como 739 copias/gen de referencia [9; 26]. Si se comparan nuestros resultados con los de otras localizaciones anatómicas como por ejemplo el esófago, se puede decir que el número de copias de E6-VPH16 son similares, se encuentra cercano a $2,55 \pm 3,19$ copias por célula [27], en este orden de ideas Si y col (2005) [28] reportan que en China la carga viral promedio varía entre <1 a 157 copias por célula en dicha localización anatómica; como se puede observar son valores significativamente bajos si se comparan con los descritos para cuello uterino, vagina y vulva, cuyos reportes alcanzan valores de hasta más de 1 millón de copias del gen E6 de VPH-16 [27; 29].

Como puede observarse, la carga viral no es constante y además presentan diferencias notables entre localizaciones anatómicas, por lo que ha resultado de gran utilidad evaluar la integración del genoma viral al genoma de la célula

hospedera, ya que estudios previos revelan que el estado del genoma viral es un factor pronóstico importante, que en conjunto con factores epigenéticos se relacionan con la progresión del cáncer [30], en este sentido se ha reportado que aquellos casos con VPH episomal muestran un pronóstico favorable, sugiriendo que la integración podría modificar de alguna forma la biología de los tumores [31]. El 86% de las muestras incluidas en este trabajo presentó integración del genoma viral al genoma de las células hospederas lo que es consistente con otras investigaciones como la realizada por Olthof y col (2012) [32]; Otlthof et al (2015) [33] y Mellin col. (2002) [31], quienes indican un alto porcentaje de integración, igualmente que la carga viral es variable en CCECC y que una alta carga viral se asocia con un estatus preferentemente episomal que está relacionada significativamente con un mejor pronóstico mientras que cargas bajas se relacionan con integración y mal pronóstico, lo que se observó en el presente trabajo, donde aquellos casos de cavidad oral y laringe, en los que la carga viral es baja fue donde se detectó un mayor porcentaje de integración, de forma contraria, en los tumores de orofaringe la carga viral fue alta respecto a las otras localizaciones anatómicas evaluadas, y el ADN viral se encontró de forma preferentemente episomal, lo que se relacionó con un mejor pronóstico ($p=0,016$).

Las investigaciones al respecto atribuyen estas diferencias al hecho de que posiblemente los pacientes con alta carga viral inducen una mejor respuesta inmunitaria contra el cáncer, aunque esta hipótesis no se ha podido confirmar y se requieren más estudios que la apoyen. Es importante mencionar que aunque existen variaciones notables en la carga viral entre las diferentes localizaciones

anatómicas, el porcentaje promedio de integración es similar como lo describe la investigación realizada por Groves y Coleman. (2015) [34] en cuello uterino. Es importante mencionar que este proceso de integración requiere la ruptura tanto del genoma viral como del genoma de la célula hospedera y se cree que la tasa de integración es proporcional a los niveles de daños sufridos por el ADN. Estos daños se han descrito como endógenos y exógenos, incluyendo el efecto del alcohol y tabaco así como la infección por VPH o por otros agentes infecciosos incluyendo otros virus como por ejemplo Virus Epstein-Barr (VEB), todos factores de riesgo para el desarrollo de CCECC, esto desencadena en la activación de mecanismos de reparación del ADN así como a procesos de alteración cromosomal que pueden contribuir al proceso de integración [35].

Posterior al seguimiento por un período de 120 meses los análisis de la sobrevida de los pacientes relacionada con cada una de las variables se pudo notar, hay una tendencia de disminución en la sobrevida en aquellos pacientes que pertenecen al género masculino, lo que se notó también en aquellos pacientes que incurren en prácticas de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco, así como aquellos que presentaban un diagnóstico en estadios avanzados (EIII y EIV). Igualmente no se pudo demostrar que la presencia de la infección por VPH tenga un efecto directo en la sobrevida, sin embargo pareciera que la integración del genoma viral podría ser el factor determinante, ya que en aquellos casos en los que el genoma de VPH-16 se encontraba integrado la sobrevida es menor que en aquellos casos en los que se encontraba de forma episomal aunque no se

hallaron evidencias estadísticamente significativas que lo apoyen, lo que se puede atribuir al bajo número de la muestra incluida (figura 1 y 2).

Conclusiones

La cavidad oral es la localización anatómica más frecuente de aparición tumoral, lo que se puede deber a que está en contacto directo con los agentes etiológicos. Por otro lado la presencia de VPH-16 queda establecida como la infección viral más frecuente, considerándose al estado físico del genoma viral como el factor determinante para poder establecer la respuesta a las terapias empleadas. Se sugiere que aquellos pacientes VPH positivos especialmente de orofaringe tienen un mejor pronóstico que aquellos que desarrollan este tipo de cáncer en otra localización anatómica del tracto aerodigestivo superior, estas diferencias en el pronóstico se pueden deber al estado físico en el que se encuentra el genoma viral en la célula hospedera. Sin embargo cabe destacar la necesidad de realizar más estudios en los que se puedan evidenciar el papel de la infección por VPH en la carcinogénesis.

Agradecimientos: Investigación financiada por FONACIT bajo los proyectos de investigación G-2005000408, 2013000413 y Misión Ciencia LPL-20074001088.

Referencias Bibliográficas

1. **Spitz M, Fueger J, Goepfert H.** Squamous cell carcinoma of the aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 1988; 61: 203.
2. **Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt E, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G.** Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Act of Otolaryngology*. 2005; 125: 1327-1336.

3. **Martinez I, Wang J, Hobson K, Ferris R, Khan S.** Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *European Journal of Cancer.* 2007; 43(2): 415–432.
4. **Badulescu F, Crisan A., Badulescu A, Schenker M.** Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* 2010; 51(3):437–440
5. **Haigentz M.** Aerodigestive cancers in HIV infection. *Current Opinion in Oncology.* 2005;17:474–478.
6. **Gillison ML.** Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implication for clinical research in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006; 24:5623-5625
7. **Mork J, Lie A, Glatte E, Hallmans G, Jellum , Koskela, et al.** Human papillomavirus types in head and neck squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine.*
8. **Burns, J, Maitland, N.** Human papillomaviruses and cancer. *Microbiology Tod.* 2005;56: 116-120.
9. **Koskinen W, Chen R, Leivo I, Mâkitie A, Bäck L, Kontio R, y col.** Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *International Journal of Cancer.* 2003;107:401-406.
10. **Arias F, Villafranca E, Dueñas MT, Vera R.** Factores de pronóstico en carcinoma de cabeza y cuello. *Servicio de oncología, Hospital de Navarra. Pamplona.* 2007.
11. **Veitía D, Liuzzi J, Ávila M, De Guglielmo Z; Prado Z, Prado Y, Correnti M.** Human Papillomavirus detection in Head and neck squamous cell carcinoma. *ecancermedicalscience.* 2014;8:475-482.
12. **Salazar C, Smith R, Garg M, Haigentz M, Schiff B, Kawachi N, et al.** Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival: A Comparison by Tumor Site and Initial Treatment. *Head and Neck Pathology.* 2014;8:77–87.
13. Faust H, Eldenhed E, Roslin A, Wennerberg J, Forsslund O. Prevalence of human papillomavirus types, viral load and physical status of HPV16 in head and neck squamous cell carcinoma from the South Swedish Health Care Region. *Journal of general virology.* 2016;97:2949-2956.
14. Harlé A, Guillet J, Thomas J, Demange J, Dolivet G, Peiffert D, et al. HPV insertional pattern as a personalized tumor marker for the optimized tumor diagnosis and follow-up of patients with HPV-associated carcinomas: a case report. *BMC cancer.* 2019;19:277-284.
15. Yang R, Klimentová J, Göckel-Krzikalla E, Ly R, Gmelin N, Hotz-Wagenblatt A, Rehulková H, Stulík J, Rösl F, Niebler M. Combined transcriptome and proteome analysis of immortalized human keratinocytes expressing human papillomavirus 16 (HPV16) oncogenes reveals novel key factors and networks in HPV-induced carcinogenesis. *mSphere.* 2019;4:e00129-19.

16. Veitía D, Liuzzi J, Ávila M, De Guglielmo Z, Correnti M. Prevalence of HPV and EBV infection and their relationship with the p53 and PCNA expression in oral carcinoma patients. *J Oral Res* 2017;6(4):86-91.
17. Cordero A, Ruíz A, Veitía D, Ávila M, Fernandes A, Coello C, Mata J, Correnti M. Detección molecular de la infección por VPH en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. *Revista venezolana de oncología*.2017;29(3):194-200.
18. Tao Y, Sturgis E, Huang Z, Wang Y, Wei P, Rui J, et al. TGF- β 1 genetic variants predict clinical outcomes of HPV positive oropharyngeal cancer patients after definitive radiotherapy. *Clinical of cancer research*. 2018;24(9):2225-2233.
19. **Del Río L, Soto S, Camargo M, Moreno D, Sánchez R, Pérez A, et al.**The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer*: 2015; 15:100-111.
20. **Betiol J, Villa L, Sicheo L.** Impact of HPV infection on the development of head and Neck cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013;46:217-226.
21. **Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML.** Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Research*. 2000;20:1301–1306
22. **Ringstrom E, Peters E, Hasegawa.** Human Papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer. Research*. 2002;8:3187-3192
23. **Correnti M, Rivera H, Caazza ME.** Detection of Human Papillomavirus of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Oncology/Microbiology. Oral Diseases*.2004;10:163-166.
24. **Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Anwar M, Bukhari MH, Carrascal E, y col.** Human Papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries. *Journal of Clinical Virology*. 2011;17:5295-5304
25. **Kreimer A, Clifford G, Boyle P, Francsechi S.** Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology Biomarkeres Preview*. 2005;14:467-475.
26. **Speel EJ.**HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Cause and Consequence.Recent Results Cancer Res.2017;206:57-72.
27. **Zhang D, Zhang Q, Zhou L, Huo L, Zhang Y, Shen Z, et al.**Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus- 16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study. *BMC Cancer*. 2010; 10:650-658.
28. **Si H, Wah S, Ping C, Wong Y, Man A.** Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32: 19–23.
29. **Lillsunde G, Helenius G, Sorbe B, Karlsson M.** Viral Load, Integration and Methylation of E2BS3 and 4 in Human Papilloma Virus (HPV) 16- Positive Vaginal and Vulvar Carcinomas. *PLOS ONE*. 2014;9(11):e112839.

30. Hatano T, Sano D, Takahashi H, Hyakusoku H, Isono Y, Shimada S, et al. Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the ensuing patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *International journal of cancer*. 2017;140(7):1571-1580.
31. **Mellin H, Dahlgren L, Muner E, Lindholm J, Ribbani H, Kalantari M, et al.** Human Papillomavirus type 16 is an episomal and high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *International Journal of Cancer*. 2002;1002:152-158.
32. **Olthof N, Straetmans J, Snoeck R, Ramaekers F, Kremer B, Speel E.** Next generation treatment strategies for HPV-related head and neck squamous cell carcinomas: where do we go?. *Review Medical of Virology*. 2012; 22:88–105
33. Olthof NC, Huebbers CU, Kolligs J, Henfling M, Ramaekers FC, Cornet I, et al. Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int J Cancer*. 2015;136:E207–18
34. **Groves I, Coleman N.** Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *Journal of Pathology*. 2015; 235:527–538.
35. **Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al.** Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *Journal of Medical Virology*. 2016; 88:336–344.

Tabla 1.- Secuencias de los iniciadores empleados en la PCR en tiempo real para la cuantificación del genoma viral.

Nombre del iniciador	Secuencia 5'----> 3'
HPV-16 E2F primer	ACGACTATCCAGCGACCAAGAT
HPV-16 E2R primer	CCACTGAGTCTCTGTGCAACAAC
HPV-16 E6F primer	GCACAGAGCTGCAAACAACTATACA
HPV-16 E6R primer	TCCCGAAAAGCAAAGTCATATACC
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

Tabla 2.- Características de la muestra de estudio

Característica de la muestra	Porcentaje de pacientes (%)	p-valor
Género		
Femenino	31,25 (25/80)	0,001
Masculino	68,75 (55/80)	
Hábito tabáquico		
Si	73,75 (59/80)	0,000
No	26,25 (21/80)	
Consumo de alcohol		
Si	70 (56/80)	0,000
No	30 (24/80)	
Localización del tumor primario		
Cavidad Oral	33,8 (27/80)	0,000
Laringe	30 (24/80)	
Orofaringe	22,50 (18/80)	
Seno Paranasal	5 (4/80)	
Naso Faringe	3,80 (3/80)	
Hipofaringe	2,50 (2/80)	
Fosa Nasal	2,50 (2/80)	
Tamaño Tumoral		
T1	8,80 (7/80)	
T2	21,2 (17/80)	
T3	30 (24/80)	
T4	40 (32/80)	
Grado Tumoral		
G1	20 (16/80)	0,03
G2	43,75 (35/80)	
G3	36,25 (29/80)	
Estadio Tumoral		
EI	6,30 (5/80)	0,000
EII	12,50 (10/80)	
EIII	27,50 (22/80)	
EIV	53,8 (43/80)	

Tabla 3.- Infección por VPH en pacientes con CCECC

Detección de la infección por VPH	Porcentaje de pacientes	p-valor
Positivo	66 (53/80)	0,004
Negativo	34(27/80)	
Genotipo		
16	52,8 (28/53)	0,000
Otros genotipos BR**	20,7 (11/53)	
Otros genotipos AR*	26,4 (14/53)	
Localización anatómica		
Cavidad oral	34 (18/53)	0,606
Laringe	28(15/53)	
Orofaringe	23(12/53)	
Seno paranasal	8 (4/53)	
Hipofaringe	4(2/53)	
Nasofaringe	4(2/53)	
Estadio		
EI	4 (2/53)	0,312
EII	15 (8/53)	
EIII	26(14/53)	
EIV	55(29/53)	

*Otros genotipos AR: Otros genotipos de alto riesgo; **Otros genotipos BR:Otros genotipos de bajo riesgo

Tabla 4.- Carga y estado físico de VPH en pacientes con CCECC

Sitio del tumor	Datos clínicos					Carga viral y estatus físico de VPH-16	
	T	N	VPH	Copias de E6/ β -globina	Copias de E2/ β -globina	Radio E2/E6	Estatus físico del virus
Orofaringe	4	2b	16 y 18	ND*	0	No E2	Integrado
Laringe	3	0	16	4	0	No E2	Integrado
Laringe	4	3	16	4	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	4	0	16	4	0	No E2	Integrado
Orofaringe	2	0	16	16	5	0,8	Mixto
Cavidad Oral	3	0	16	9	0	No E2	Integrado
Orofaringe	4	3	16	20	4	1,75	Episomal
Cavidad Oral	2	0	16,18 y 31	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	4	2b	16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6 y 16	5	0	No E2	Integrado
Orofaringe	3	0	16	2	0	No E2	Integrado
Laringe	4	0	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,11 y 16	8	0	No E2	Integrado
Orofaringe	4	0	11 y 61	10	7	0,5	Mixto
Cavidad Oral	2	3	6,11 y 16	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	4	2b	11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	1	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Hipofaringe	4	2c	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Laringe	3	3	6,11 y 16	4	0	No E2	Integrado
Laringe	3	0	6,11 y 16	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	0	6,11,16,18	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	3	0	6,11 y 16	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Nasofaringe	4	3	11,16 y 51	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Cavidad Oral	1	0	6,11,16,53	4	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,11 y 16	2	0	No E2	Integrado
Hipofaringe	2	3	6,11,16,31	ND*	0	No E2 No E6	NA**
Orofaringe	2	2b	6,11,16,31	3	0	No E2	Integrado
Laringe	2	0	6,16,18,31	3	0	No E2	Integrado
Cavidad Oral	2	1	6,16,18,31	4	0	No E2 No E6	NA**
Nasofaringe	3	0	6,11,16,31	ND*	0	No E2 No E6	NA**

NA** No aplica. ND* No determinada

Curvas de sobrevida en pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

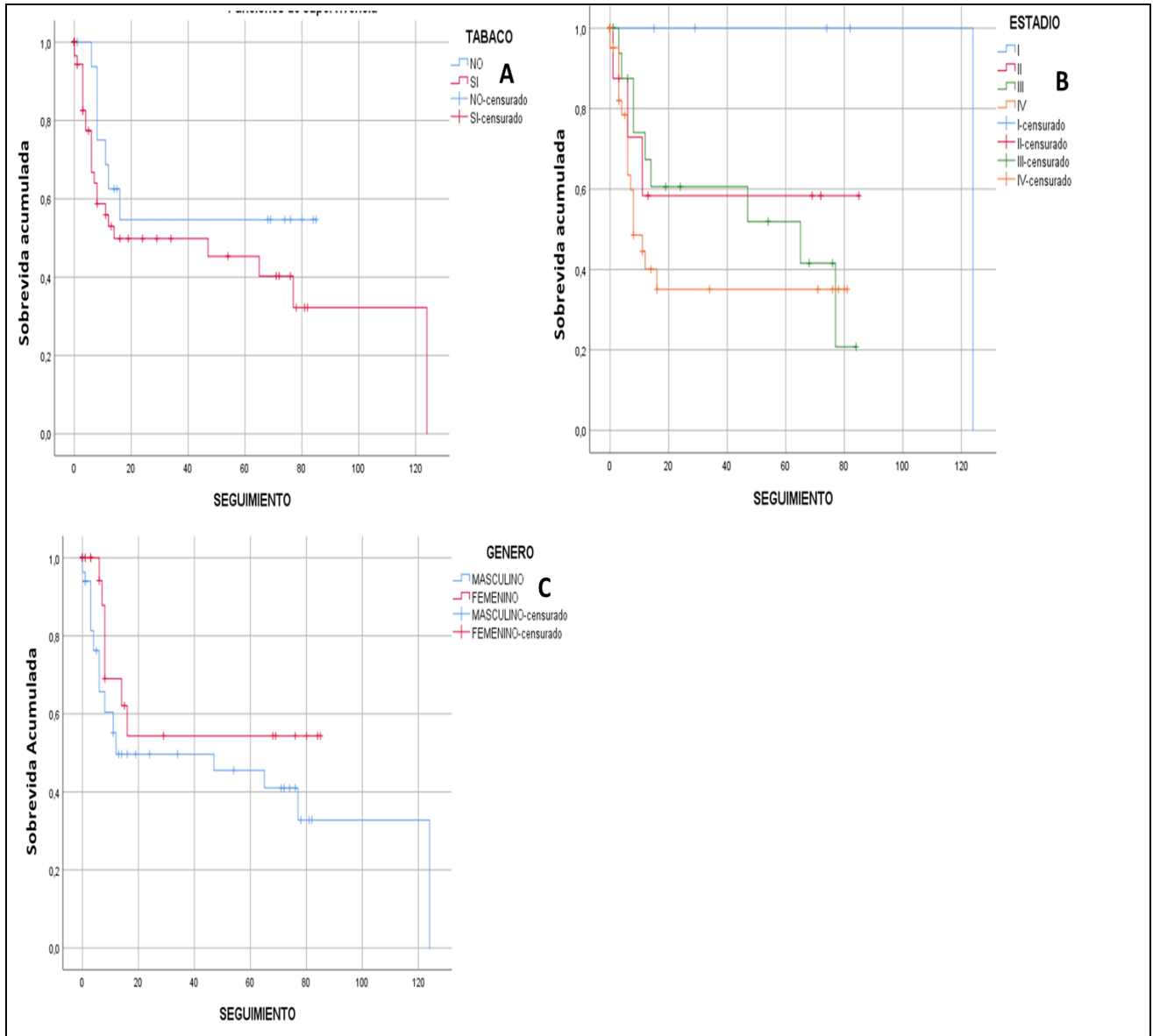


Figura 1.- Curvas de sobrevida de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. A) pacientes con CCECC en relación al consumo de tabaco, (n=80.p=0,187). B) Pacientes con CCECC respecto al estadio tumoral (n=80.p=0,087. C) pacientes con CCECC en relación al género de los pacientes (n=80. p=0,171).

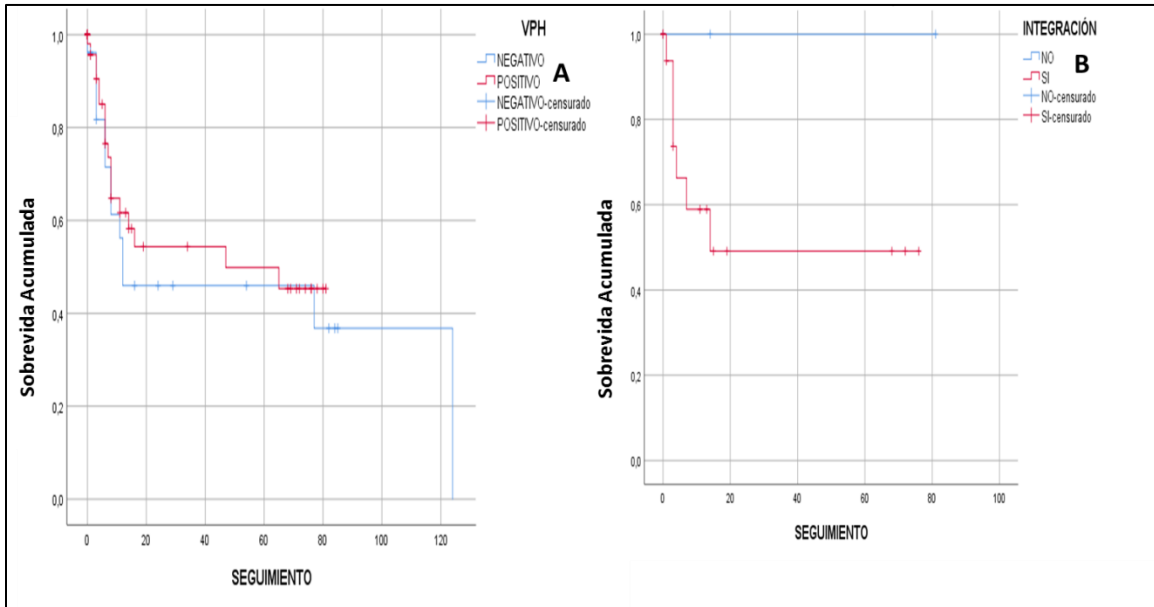


Figura 2.- Análisis de sobrevida de pacientes con Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello en relación a: A) presencia del genoma de VPH (sin distinción de genotipo) (n=53. $p>0,05$). B) Integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera (n=28. $p>0,05$).