



**MODULACION DE LA METILACION DEL ADN EN LESIONES PRECANCEROSAS
ASOCIADAS AL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN CAVIDAD ORAL**

MARIA ROSA BUENAHORA TOBAR

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA - MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
BOGOTÁ, D.C. AGOSTO - 2018**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad El Bosque

Facultad Odontología

Programa Maestría en Ciencias Odontológicas

Título: Modulación de la metilación del ADN en lesiones precancerosas asociadas al virus del papiloma humano en cavidad oral

Grupo(s) de Investigación UIBO Unidad de Investigación Básica Oral
UNIECLO Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica Oral

Línea de investigación: Cáncer oral

Tipo de investigación: Maestría /Grupo

Estudiante: María Rosa Buenahora Tobar

Director: Sandra Janneth Perdomo Lara

Codirectores : Gloria Ines Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector Académico
FRANCISCO JOSE FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador Investigación Facultad de odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ	Coordinador Postgrados Odontología
LINA VIVIANA MILLAN	Coordinadora Maestría en Ciencias Odontológicas

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las doctoras Sandra Perdomo y Gloria Lafaurie por el acompañamiento, por sus enseñanzas y las horas de dedicación durante estos años. De igual manera al laboratorio de investigación UIBO y el laboratorio de Investigación UGRA de la Universidad El Bosque, el Instituto de Biotecnología (IBU) de la Universidad Nacional y a CORPOICA en cabeza de la Dra Yolanda Gomez Vargas, por el aporte tecnológico indispensable para la realización de este trabajo.

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

RESUMEN

MODULACION DE LA METILACION DEL ADN EN LESIONES PRECANCEROSAS ASOCIADAS AL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN CAVIDAD ORAL

Antecedentes: Estudios desarrollados en las últimas décadas han evidenciado al VPH como un agente carcinogénico en cavidad oral. Se ha observado que el VPH actúa como factor epigenético produciendo alteración en la metilación del ADN siendo clave para la transformación maligna de las lesiones precancerosas de cavidad oral. Las alteraciones en los patrones de metilación inducen cambios en la respuesta inmune, la regulación del ciclo celular y el crecimiento celular. **Objetivo:** Identificar la metilación del ADN por VPH en lesiones precancerosas de la cavidad oral. **Métodos:** Se evaluaron 40 muestras de cavidad oral con diagnóstico clínico e histológico de lesión precancerosa. Se realizó inmunohistoquímica para positividad de p16, así como la identificación y genotipificación de virus de papiloma humano (VPH) para determinar los grupos. Se realizaron librerías genómicas de secuenciación de bisulfito reducida y representativa (RRBS) y se realizó análisis bioinformático para determinar porcentaje de metilación de islas CpG por grupo e identificación de genes metilados. **Resultados:** El 70.7% de las muestras evaluadas presentaron positividad para p16 y un 48.7% de muestras VPH (+). Se identificaron 15 genotipos de alto riesgo siendo el más común el genotipo VPH 16. El grupo VPH(+) p16(+) muestra niveles más bajos de metilación comparado con el grupo VPH(-) p16(+) ($p=0.0001$). Los grupos evaluados muestran una diferencia significativa entre los genes hipometilados e hipermetilados con un valor $p=0.0001$. Las diferencias de metilación según el componente celular, según el proceso de metilación, según la función molecular y según los genes diferencialmente metilados entre los dos grupos, arrojan un valor $p = 0.005$. Los genes diferencialmente metilados asociados a la regulación de interferones fueron DHX58, DDX58, NLRP4, IRF7, TOR1A, MSX1 observándose una regulación positiva y negativa del INF que podría estar asociados a las oncoproteínas virales E5 y E7. Existe una metilación diferencial en la vía de señalización MAPK lo que puede estar relacionado con la supervivencia de los queratinocitos evadiendo la apoptosis. **Conclusiones:** El VPH modula diferencialmente el grado de metilación del DNA en lesiones precancerosas de cavidad oral. **Palabras Clave:** lesión precancerosa, cavidad oral, virus del papiloma humano, metilación del ADN.

ABSTRACT

MODULATION OF DNA METHYLATION IN PRECANCEROUS INJURIES ASSOCIATED WITH THE HUMAN PAPILOMA VIRUS IN THE ORAL CAVITY

Background: Studies developed in the last decades have shown HPV as a carcinogenic agent in the oral cavity. It has been observed that HPV acts as an epigenetic factor causing alteration in DNA methylation, thus being a key factor in the malignant transformation of precancerous lesions of the oral cavity. Alterations in methylation patterns induce changes in the immune response, regulation of the cell cycle and cell growth. **Aim:** Identify DNA methylation by HPV in precancerous lesions of the oral cavity. **Method:** 40 oral cavity samples with clinical and histological diagnosis of precancerous lesion were evaluated. Immunohistochemistry was performed for p16 positivity, as well as the identification and genotyping of human papilloma virus (HPV) to determine the groups. Genomic libraries of reduced and representative bisulfite sequencing (RRBS) were created and bioinformatic analysis was performed to determine the percentage of CpG island methylation by group and identification of methylated genes. **Results:** 70.7% of the samples evaluated were positive for p16 and 48.7% for HPV(+). 15 high-risk genotypes were identified, the most common genotype being HPV 16. The HPV (+) p16 (+) group shows lower levels of methylation compared to the HPV (-) p16 (+) group ($p = 0.0001$). The groups evaluated show a significant difference between hypomethylated and hypermethylated genes with a value $p = 0.0001$. The methylation differences according to the cellular component, according to the methylation process, according to the molecular function and according to the differentially methylated genes between the two groups, give a value $p = 0.005$. The differentially methylated genes associated with the regulation of interferons was DHX58, DDX58, NLRP4, IRF7, TOR1A, MSX1 looking a positive and negative regulation of INF that could be associated with the viral oncoproteins E5 and E7. The differential methylation in the MAPK signaling pathway, may be related to the survival of keratinocytes, evading apoptosis. **Conclusions:** HPV differentially modulates the degree of DNA methylation in precancerous lesions of the oral cavity. **Key Words:** precancerous lesion, oral cavity, human papilloma virus, DNA methylation.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1. EPIDEMIOLOGIA DEL VPH EN LESIONES DE CAVIDAD ORAL	3
2.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	4
2.2.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VPH	4
2.3 PATOGÉNESIS DE LA INFECCION POR VPH	9
2.4 LESIONES ORALES ASOCIADAS A INFECCION DE VPH	12
2.5 p16(INK4A) COMO MARCADOR DE LESIONES ORALES ASOCIADAS A VPH	12
2.6 METILACION DEL ADN EN CANCER	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. JUSTIFICACION	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVOS GENERALES	23
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
6. METODOLOGIA	24
6.1 TIPO DE ESTUDIO	24
6.2 POBLACION MUESTRA	24
6.3 METODOS Y TECNICAS PARA LA RECOLECCION DE LA MUESTRA	24
6.3.1 CRITERIOS DE INCLUSION	24
6.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSION	25
6.4 DETECION DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P16 POR INMUNOHISTOQUIMICA	25
6.5 EXTRACCION DE ADN Y POSITIVIDAD DE VPH	26
6.6 GENOTIPIFICACION DE VPH POR LUMINEX	26
6.7 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE BISULFITO REDUCIDA Y REPRESENTATIVA (RRBS)	26
6.8 LIBRERÍA GENOMICA Y ANALISIS BIOINFORMATICO DEL PERFIL DE METILACION DEL ADN POR RRBS	30

6.9 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS	32
6.9.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA	32
6.9.2 ESTADISTICA ANALITICA	32
6.9.3 ANALISIS BIOINFORMATICO	32
7. CONSIDERACIONES ETICAS	33
8. RESULTADOS	34
8.1 CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRAFICAS	34
8.2 LOCALIZACION Y DIAGNOSTICO CLINICO DE LA LESION	35
8.3 DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO	36
8.4 IDENTIFICACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA p16 Y GENOTIPIFICACION DEL VPH	36
8.5 GENOTIFICACIÓN DE VPH DE LAS MUESTRAS EVALUADAS	39
8.6 OBTENCIÓN DE LIBRERÍAS RRBS PARA SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN (NGS)	40
8.7 SECUENCIACION POR BISULFITO DEL ADN POR RRBS	42
8.8 LIMPIEZA DE ADAPTADORES FastQ	45
8.9 VISUALIZACION ANALISIS DE SECUENCIACION CON EL PROGRAMA BIOINFORMATICO SeqMonk	49
8.10 NIVEL DE METILACION DIFERENCIAL ENTRE LAS MUESTRAS VPH(+) Y VPH(-)	53
9. DISCUSION	63
10. CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Genes del VPH y sus principales funciones.	5
Tabla 2. Criterios usados para diagnosticar displasia según OMS	12
Tabla 3 Secuencia de los adaptadores por muestra	29
Tabla 4 Variables sociodemográficas de la población total	34
Tabla 5 Localización de la lesión y Diagnóstico clínico tomados de los reportes Histopatológicos	35
Tabla 6 Diagnostico Histopatológico e inmunohistoquímica para p16	36
Tabla 7 Relación entre VPH y p16 de las muestras evaluadas	37
Tabla 8. Clasificación de p16 según la proporción histológica del marcaje	37
Tabla 9 Relación entre VPH y p16 según diagnóstico histopatológico	38
Tabla 10 Concentración en ng/μL de las librerías genómicas RRBS	40
Tabla 11 Número de pb y %CG antes y después de la limpieza de adaptadores	45
Tabla 12. Número de genes metilados por cromosomas y Metilación diferencial por grupo	54
Tabla 13. Componente celular de genes diferencialmente metilados	58
Tabla 14. Proceso de metilación según genes diferencialmente metilados	59
Tabla 15. Función molecular de genes diferencialmente metilados	60
Tabla 16. Vías de señalización de genes diferencialmente metilados	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del virus de papiloma humano tipo 16	5
Figura 2. Células normales y células infectadas por VPH	10
Figura 3. Mecanismo de acción carcinógena del VPH de alto riesgo	11
Figura 4. Mecanismo de silenciamiento de genes por metilación	14
Figura 5. Estructura de la citosina y 5-metilcitosina	16
Figura 6. Flujo grama de diseño, selección y exclusión de muestras de lesiones potencialmente malignas	25
Figura 7. Inmunohistoquímica patrón positivo en parches y patrón positivo focal	26
Figura 8. Tratamiento con bisulfito sódico	28
Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de preparación librería genómica y análisis bioinformático de la metilación del ADN.	30
Figura 10. Secuencia de la limpieza de adaptadores	31
Figura 11. Patrón de IHC positiva para p16	38
Figura 12. Identificación de genotipos del VPH	39
Figura 13: Resultados del control de calidad para las librerías RRBS	40
Figura 14: Q30 de las lecturas de illumina para cada una de las líneas del Hiseq 6 y 7	42
Figura 15: Diagrama de Cajas que representa la distribución de densidad de los datos	43
Figura 16: Proceso de clusterización realizado en la corrida	43
Figura 17: Intensidad de detección de las bases nitrogenadas	44
Figura 18. Gráfico de calidad de las muestras antes y después de la limpieza de adaptadores	46
Figura 19. Pares de bases por fragmentos de ADN	47
Figura 20. Porcentaje de islas CG comparada con la distribución teórica de islas para cada muestra	48
Figura 21: Adaptadores	49
Figura 22 a y b: Comparación de islas CpG metiladas por cromosoma según cada grupo	50
Figura 23: Diagrama de bigotes de las muestras del grupo VPH (-) y el grupo VPH (+)	52

Figura 24. Mapa de calor de islas CpG metiladas por gen en ambos grupos	53
Figura 25: Porcentaje de metilación por cromosoma en cada grupo de estudio	56
Figura 26: Número de genes metilados por cromosoma	57
Figura 27: Numero de citocinas metiladas por cromosoma	57
Figura 28: Ontología de los genes diferencialmente metilados según el componente celular.	58
Figura 29: Ontología de los genes diferencialmente metilados según el proceso	59
Figura 30: Ontología de los genes diferencialmente metilados según la función molecular	60
Figura 31: Vías de señalización enriquecidas de genes diferencialmente Metilados	61
Figura 32. Porcentaje de Metilación de los genes implicados en regulación del citoesqueleto	62
Figura 33. Porcentaje de Metilación de los genes implicados en regulación del sistema inmunológico	62

INTRODUCCION

El carcinoma escamo celular de cabeza y cuello se ubica como el sexto cáncer en frecuencia a nivel mundial [Warnakulasuriya S, 2009] y llega a representar entre el 80 al 90% de todos los canceres localizados en esta zona [Johnson & Jayasekara, 2000], este ha sido atribuido a factores de riesgo como el tabaco y alcohol, sin embargo existe un porcentaje de estos carcinomas que se desarrollan en pacientes cuyo factor de riesgo es el VPH [Zhu, *et al.* 2012].

Investigaciones realizadas en las últimas décadas han evidenciado al (VPH) como un potencial agente carcinogénico de vías aerodigestivas altas que incluyen la cavidad oral [Reuschenbach, 2013. Gillison *et al.*, 2000, Kreimer *et al.*, 2005, Gillison *et al.*, 2014]. La IARC en el año 2009 lo reconoce como un agente causal de cancer oral particularmente asociado al genotipo VPH16. A nivel mundial se ha reportado una prevalencia del VPH asociado a cancer de cavidad oral en un 20.2% [Isayeva *et al.*, 2012], así como un 19.9% en lesiones pre malignas [Giovannelli *et al.* 2002].

Dentro de los estudios de inmunohistoquímica utilizados para evaluar el potencial carcinogénico del VPH así como el pronóstico, la sobreexpresión de la proteína p16INK4a ha sido una de las más estudiadas, demostrando que este se asocia a casi todos los carcinomas escamocelulares positivos para VPH, indicando que el virus es transcripcionalmente activo [Woo SB, Cashman EC, Lerman MA, 2013].

En la actualidad algunos estudios han observado que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH producen alteraciones en la metilación del ADN y representan un papel clave en la transformación maligna de las lesiones precancerosas, estos cambios conllevan al silenciamiento de genes supresores de tumores y a la sobreexpresión de oncogenes. A diferencia de las células normales, las células cancerosas exhiben alteraciones en los patrones de metilación que inducen cambios en la regulación del ciclo y el crecimiento celular [Lechner *et al.*, 2013].

Los cambios de metilación del ADN en las células cancerosas, se localizan principalmente en los dinucleótidos CpG. La hipometilación y la hipermetilación ocurren en sitios específicos del genoma, pero éstos son diferentes dependiendo del tipo de células cancerosas, sugiriendo una etiología distinta, y el hecho de que ambas situaciones pueden preceder a la malignidad, indica

que no son una simple consecuencia del proceso neoplásico [Guerrero-Preston *et al.*, 2009]. La hipometilación es un evento temprano de la transformación celular que puede observarse en el genoma de células pre neoplásicas y la hipermetilación de los genes supresores tumorales, también se han descrito en lesiones pre neoplásicas apoyando la hipótesis de que las alteraciones epigenéticas son eventos tempranos en la carcinogénesis [Jones & Baylin, 2002; Guerrero-Preston *et al.*, 2009].

El propósito de este estudio es demostrar como el VPH como factor epigenético, puede modular la metilación del ADN en lesiones que clínicamente se diagnostican como precancerosas en la cavidad oral, y que histológicamente presentan algún grado de displasia.

2. MARCO TEORICO

2.1. EPIDEMIOLOGIA DEL VPH EN LESIONES DE CAVIDAD ORAL

En la actualidad el cancer de cabeza y cuello constituye un importante tema de salud teniendo en cuenta, que su incidencia anual ha tenido un incremento importante durante las últimas tres décadas. Algunos estudios afirman que dichas lesiones representan el quinto cáncer más común y la sexta causa de mortalidad en el mundo [Goon *et al.*, 2009]. Aunque se considera que el cáncer oral es una enfermedad de etiología multifactorial, de forma interesante estos tumores se están desarrollando en pacientes sin antecedentes de tabaquismo y alcohol, argumentando la presencia de un agente etiológico adicional como el virus del papiloma humano (VPH) [Rautava & Syrjänen, 2011].

Se ha establecido que la presencia de VPH en los carcinomas orales, tienen una alta asociación con los tipos virales causantes de cáncer cervical y La Agencia Internacional de investigación del cáncer [IARC, 2007] ha reconocido al VPH como un factor etiológico para el desarrollo de esta neoplasia en cavidad oral.

A nivel mundial varios estudios, han reportado la presencia del VPH en lesiones orales. A este respecto Kreimer *et al*, en el 2005, encontraron una prevalencia de VPH del 25.9% [95% IC 24.7-27.2] luego de evaluar 4,195 muestras de carcinomas de cabeza y cuello siendo significativamente más alta en la orofaringe (35,6% de los 969 casos) que en el resto de la cavidad oral (23.5% de los 2642 casos), y el genotipo VPH 16 el más prevalente en Norte América comparado con de Europa y Asia [Kreimer, 2005].

En Latinoamérica la frecuencia de VPH en cáncer oral ha sido reportado entre el 27.4 al 60% [Ibieta, 2005; Premoli-De-Percoco, 2001], de igual manera en lesiones premalignas se reporta una prevalencia entre el 17% y 80% para el genotipo VPH16 [Agrawal *et al.* 2013.; Syrjänen *et al.*, 2011], y una prevalencia del 86% para el genotipo VPH-18 [Giovannelli *et al.*, 2002]. Adicionalmente, Jayaprakash en el 2011 reportó un aumento en la detección de VPH-16/18 en lesiones con displasia y cáncer invasivo comparado con biopsias de tejido sano sin observar diferencia entre los genotipos 16 y 18 para los casos de displasias moderadas y severas. Babiker en el 2013 reporta presencia de VPH de alto riesgo 16 y 18 en lesiones de cáncer oral en un

4porcentaje de 66.7% siendo mas prevalente el VPH 16.

Otros estudios han reportado presencia de genotipos virales entre un 17% y un 80% en lesiones como liquen plano oral y leucoplasia comparándolas con mucosa de tejido sano. [Syrjänen S *et al.*, 2011].

2.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma pertenece a la familia Papillomaviridae, son virus desnudos que miden entre 52 a 55nm de diámetro, cubiertos por una cápside icosaédrica y un genoma de DNA de doble cadena circular, que mide alrededor de 8.000pb [Martin-Hernan *et al.*, 2013]; su cápside esta conformada por dos proteínas, L1 como estructura primaria, donde cada partícula viral contiene 360 copias, organizadas en 72 capsómeros y L2 se encuentra en menor proporción que la anterior, localizadas en el centro de cada capsómero pentavalente en los vértices del virión [IARC, 2005; Smith *et al.*, 2008].

2.2.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VPH

El genoma del virus del papiloma humano (figura 1, tabla 1), se encuentra organizado en ocho genes principales que codifican en una sola cadena de ADN viral, dispuesto en bloques separados que consisten en regiones de lectura abierta ORF, (Open Reading Frame), regiones designadas como genes tempranos (E) y tardíos (L). Los genes tempranos codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E5, E6 y E7), y los tardíos codifican proteínas de la capside (L1 y L2). Además poseen una región denominada región reguladora ascendente (URR) o región larga de control (LCR) que contiene secuencias para la replicación y expresión genética del VPH [Mcmurray H *et al.*, 2001; Frago *et al.*, 2012; López-Saavedra, 2006]. Las proteínas E6 y E7, productos de la región temprana, son las encargadas de inmortalizar la célula hospedera y del proceso carcinogénico.

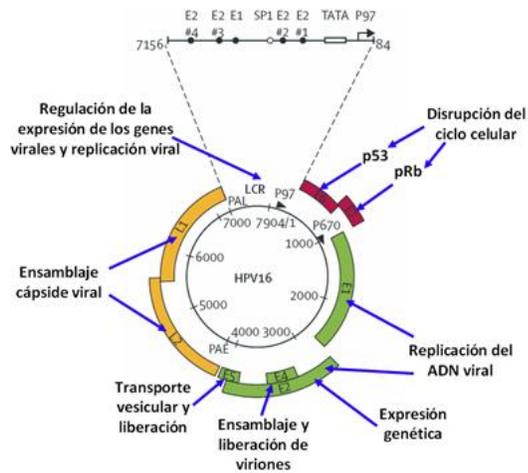


Figura 1 Genoma del virus de papiloma humano tipo 16. Genes E1 y E2, que regulan la replicación y la transcripción viral; la región constituida por los genes E5, E6 y E7, que codifican proteínas con alto poder oncogénico; la región LCR o Long Control Region, en donde se localizan las secuencias de ADN que contienen los promotores y sitios de iniciación de replicación del genoma viral, y la región conformada por los genes estructurales L1 y L2, que codifican las proteínas que forman la cápside. Figura adaptada de *Human papillomavirus and cervical cancer* [Schiffman et al., 2007]

Tabla 1. Genes del VPH y sus principales funciones.

GEN	FUNCION DE SUS PRODUCTOS
E1	ATPasa y ADN helicasa reconoce y esta unido al origen viral de replicación de ADN como un complejo hexametrico. Participa en el inicio de la replicación y transcripción del DNA viral
E2	Proteína reguladora de la transcripción viral génica, se une al promotor viral transcripcional como un dímero y actúa como auxiliar en el proceso de la replicación del ADN viral. Interactúa y recluta a la proteína E1
E4	Actúa tardíamente en el ciclo vital viral, interactúa con la queratina del cito esqueleto y los filamentos intermedios rompiendo la cito queratina de la célula. Facilita el ensamblaje del virus y su liberación.
E5	Proteínas de transformación de membrana, interactúa con receptores del factor de crecimiento y otras proteínas quinasas. Induce la proliferación celular no programada.
E6	Proteína de transformación, tiene como blanco la degradación de p53. Induce la síntesis de ADN, induce telomerasa, previene la diferenciación celular. Interactúa con 4 clases de proteínas celulares: co-activadoras, transcripcionales, proteínas implicadas en polaridad de células y motilidad, así como supresores tumorales e inductores de apoptosis.
E7	Proteína de transformación, se une a la proteína de retinoblastoma (Rb). Induce la proliferación celular no programada, interactúa con factores de transcripción y enzimas remodeladoras de cromatina, activa los reguladores positivos del ciclo celular e inhibe reguladores negativos y supresores de tumores, desestabiliza centrosomas y causa defectos mitóticos.

L1	Principal proteína viral estructural. Se autoensambla en capsómeros y cápside. Interactúa con L2, con receptores celulares y contiene epitopos neutralizadores.
L2	Proteína viral estructural menor, facilita el ensamblaje del virión. Interactúa con receptores de membrana celular.

El gen E1 es el más grande y de los más conservados del VPH, presenta una secuencia de 2 Kb y la proteína de 67.5 a 76.2 kDa. [Fouts & Yu, 1999; Liu & Kuo, 1998]. E1 se une al origen de replicación, a una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la región LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexámero. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas del desenrollamiento de la doble hélice. [Gillitzer et al., 2000]. La unión de E1 a su sitio en la LCR depende a su vez de su acoplamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice.

El gen E2, de aproximadamente 1100 pb, codifica para una proteína nuclear de 45 kDa. La proteína E2 reconoce la secuencia palindrómica ACCN₆GGT, la cual se encuentra en múltiples copias dentro de la región larga de control del genoma vírico, funcionando como un activador de la transcripción. E2 contiene dos dominios funcionales, el dominio N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos (aa), y su función es importante en la activación de la transcripción, y el dominio C-terminal de aproximadamente 100 aa que interviene en la unión al ADN y su dimerización. Ambos dominios se unen entre sí por una región denominada región de bisagra, su secuencia es variable entre los diferentes genotipos de VPH [McBride, 1997; Hegde, 2002]. La replicación del genoma del VPH requiere solamente de E1 y E2, pero el mantenimiento estable en queratinocitos normales requiere la expresión de E6 y E7. [Watts KJ et al., 2001].

E2 también tienen una función anti proliferativa cuando reprime el crecimiento e induce apoptosis, ya sea por la represión de la transcripción de E6 y E7, o por el aumento de P53 [Demeret *et al.*, 1997; Desaintes *et al.*, 1997], y provoca detención en la fase del ciclo celular G1 por medio de la activación del complejo p21/ WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2 lo que conlleva a la célula transformada por VPH a senescencia [Desaintes *et al.*, 1999].

La secuencia codificante del gen E4 es de aproximadamente 260 pb, y está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4 se expresa de manera abundante durante las etapas

tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral [Doorbar *et al.*, 1998; Breitburd, 1987] y precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma cuando hay cambios epiteliales causados por VPH 16, E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones. E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas [Doorbar, 2013].

El gen E5 de aproximadamente 230 a 250 pb codifica una proteína de un peso molecular de 14 kDa. Está implicado con la transformación celular, regulando la actividad de los receptores de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el derivado de las plaquetas (PDGFR) [Zheng & Baker, 2006]. E5 es una proteína transformadora que induce a alteraciones en la actividad biológica normal y a la evasión de la respuesta inmune. En las infecciones con VPH-AR (Alto Riesgo) como el genotipo VPH 16, el EGFR se incrementa de 2 a 5 veces en los queratinocitos, lo que conduce a la proliferación celular, desempeñando un papel en la expansión del número de queratinocitos infectados por VPH [Belleudi *et al.*, 2011]. Durante la infección temprana, E5 inhibe la muerte celular programada y produce alteración de las respuestas inmunes, innata y adaptativa. La proteína E5 parece disminuir la regulación del MHC clase I (MHC-1) [Cortese *et al.*, 2010].

El gen E6 codifica una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 se expresa muy tempranamente durante una infección por VPH ayudándole a cumplir varias funciones que alteran el ambiente celular, como el bloqueo de la apoptosis mediante la ubiquitinización y degradación de la proteína p53 y el incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa [Hengstermann, 2001; Mantovani & Banks, 2001]. Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP) que reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a P53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de P53 (desde 3 horas hasta 20 minutos). Las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6-BR) no se unen a P53, o lo hacen débilmente y no lo degradan. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva. Así mismo se ha observado que E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación [Oh ST *et al.*, 2004].

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de cerca de 100 aminoácidos y un peso molecular de 10 kDa. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que controla la replicación celular y que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F. La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular [Oh ST et al., 2004].

E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, factor de transcripción AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación de E2F se expresa la Ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo la proteína E6-AR degrada a P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular [Mantovani & Banks, 2001; Münger, 2004].

La proteína L2 posee 43 a 53 kDa, representando la menor proporción de la cápside viral, que junto a L1, se producen en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa conforma cerca del 80 % de la cápside y se expresa después de L2. La cápside está constituida por 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento [Doorbar, 2013].

La región larga de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno. Puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores celulares y virales interactúan con esta región, como son las proteínas virales E1 y E2 las cuales modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus.

El VPH tiene predilección por células epiteliales de superficies cutáneas y mucosas, teniendo la capacidad de infectar y causar lesiones como verrugas comunes hasta neoplasias y cáncer

invasivo [Kreimer *et al.*, 2005], fijándose primero a proteínas como α -6 integrina y heparán – sulfato [Evander *et al.*, 1997; Giroglou *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001].

Existen varios géneros para esta familia, de los cuales sólo Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus y Gamma-papillomavirus infectan humanos. Los VPH que tienen preferencia por tejidos mucosos infectan las células epiteliales basales de la boca, garganta, tracto respiratorio o epitelio ano-genital y en cualquiera de ellos el VPH de alto riesgo podría dar origen a un proceso carcinogénico [Giovannelli *et al.*, 2002].

2.3 PATOGÉNESIS DE LA INFECCION POR VPH

La historia natural de la infección por VPH-AR implica la penetración de las partículas virales en la capa basal de la mucosa a través de micro abrasiones y la replicación del VPH en una forma episomal, que conduce a la expresión de las seis proteínas virales tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y de las dos proteínas tardías (L1, L2) (Fig 2) Las proteínas E5, E6 y E7 corresponden a los oncogenes virales y su expresión induce la inmortalización del virus y transformación de la célula. E6 y E7 inactivan p53 y Rb respectivamente, mientras que E5 contribuye a la progresión del tumor y al expresarse sola, podría exhibir un débil potencial de transformación. E5 también contribuye con los mecanismos de immunoescape y en la vía de receptores para los factores de crecimiento EGFR y KGFR [Jayaprakash *et al.*, 2011] . Una lesión persistente y sin tratar logra integrar el ADN del VPH-AR al genoma del huésped, seguido de una interrupción del gen E2, la pérdida del gen E5 y aumento de las proteínas E6 y E7.

El VPH infecta la lámina basal del epitelio escamoso estratificado compuesta por células en constante actividad mitótica que son consideradas reservorio para las regiones suprabasales, luego el ciclo de vida del VPH y su expresión proteica se relaciona directamente con la diferenciación de la célula infectada. La unión ocurre a través de receptores celulares principalmente heparán sulfato α_6 -integrina. El heparán sulfato actúa como mediador inicial del virus en la célula, permitiendo a las partículas virales entrar a través de endocitosis. Una vez dentro de la célula hospedera, el ADN viral se replica a medida que la capa basal se diferencia y migra a la superficie del epitelio. Mientras el virus se encuentra en la capa basal se mantiene en estado episomal con pocas copias de ADN y utiliza la maquinaria celular para la replicación de su genoma, cuando la célula se va diferenciando el virus aumenta su tasa de replicación y

comienza a ensamblar las proteínas L1 y L2 relacionadas con la cápside [Martin-Hernan *et al.*, 2013].

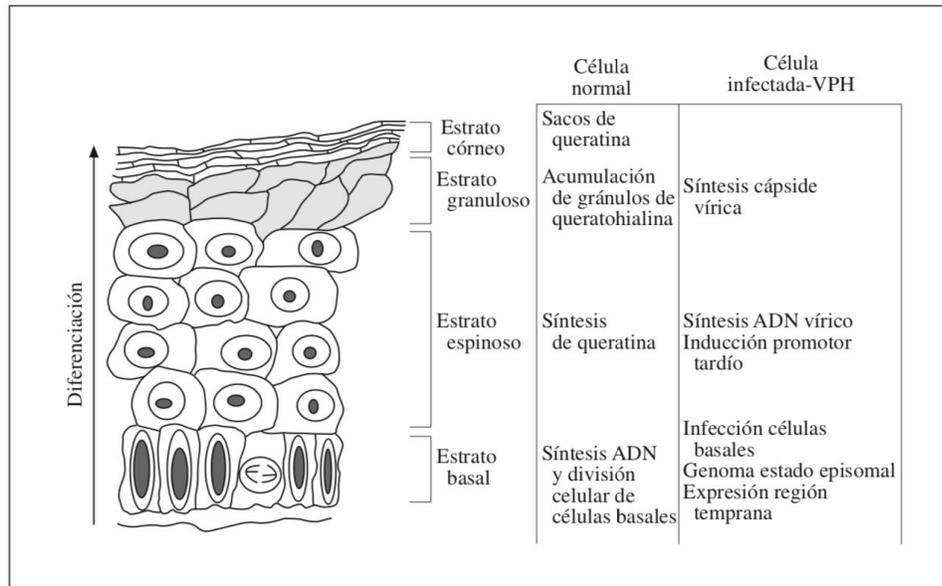


Fig. 2. Funciones de las células normales, así como de las células infectadas por virus del papiloma humano (VPH) durante la diferenciación. (Tomado de De la Cruz Hernandez *et al.*, 2004)

La replicación del ADN viral comienza con la interacción de los factores de transcripción de la célula con la región LCR del virus, los genes virales E6 y E7 son los primeros en ser transcritos [Babiker *et al.*, 2013], la proteína E6 se une con una proteína celular denominada proteína asociada a E6 (E6AP) que cumple una función de ubiquitina ligasa [Narisawa-Saito, Mako, 2007]. E6 aumenta la afinidad de E6AP por p53 promoviendo la rápida degradación de p53 mediante un complejo enzimático de ubiquitinización, lo que inactiva las funciones de p53, entre las que se encuentran: regular el ciclo celular mediante arresto en etapa G1, mediar procesos de apoptosis e intervenir en la reparación del ADN, regular la expresión de *ErbB2* y estimular otros genes supresores de tumores como *Notch1* [Babiker *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2005]. Por otra parte, la proteína E7 viral se puede unir a la forma hipofosforilada de la proteína retinoblastoma (Rb) [IARC, 2005; Martín-Hernán, 2013; Ibieta, 2005], esta unión rompe el complejo entre Rb y el factor de transcripción E2F-1, por lo que E2F-1 queda libre y se une a promotores de genes necesarios para que la célula entre en fase S del ciclo celular y así comenzar su transcripción. Sin duda el principal factor para el desarrollo de las lesiones es la sobre-expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. (Figura 3)

La proteína E5 induce un incremento en la actividad de proteínas quinasas, principalmente receptores; viéndose aumentada la respuesta celular para los factores de crecimiento y de diferenciación, resultando en una proliferación continua y diferenciación retardada de la célula epitelial anfitriona [IARC, 2007]. La transcripción de E1 que posee una actividad de helicasa separa las hebras de ADN y permite la unión del complejo de replicación, la transcripción de la proteína E2 bloquea la transcripción de E6 y E7, permitiendo que E1 se una al origen de la replicación del virus [Buck *et al.*, 2005], iniciando la replicación del ADN viral en forma extra cromosomal, en conjunto con la fase S del ciclo celular.

Las proteínas de la cápside L1 y L2 junto con la proteína E4 ensamblan el virión completo, esto sucede en las capas superiores del epitelio sin producir lisis celular [IARC, 2007]. La proteína E4 induce el colapso de la red de queratina de las células epiteliales, lo que favorece la liberación de los viriones ya ensamblados. [Buck *et al.*, 2005].

Los VPH-AR tienen la capacidad de romper su habitual estado circular, específicamente en la región que codifica a E2 para poder integrar su genoma a la célula hospedera. Al romperse la secuencia que codifica para E2 se detiene la retroalimentación negativa que esta proteína tiene sobre la transcripción de E6 y E7, favoreciendo su producción sin un elemento regulatorio, provocando la inmortalización de la célula. Las altas tasa de proliferación celular y falta de apoptosis comienzan a generar inestabilidad genómica de la célula hospedera lo que conlleva al desarrollo de cáncer [Giovannelli *et al.*, 2002].

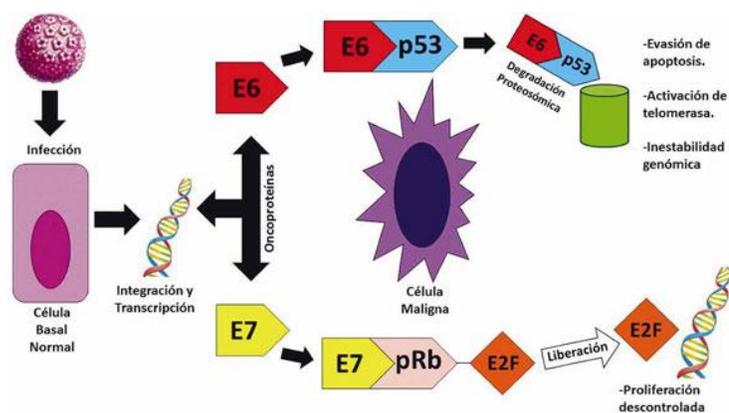


Figura 3. Mecanismo de acción carcinógena del VPH de alto riesgo. Tomado de Contreras & Venegas, 2015.

2.4 LESIONES ORALES ASOCIADAS A INFECCION DE VPH

Existen lesiones en cavidad oral que pueden estar relacionadas con la presencia de VPH y a las que se les debe prestar atención al momento de identificarlas y tratarlas. Dentro de estas lesiones están: papiloma, condiloma acuminado, verruga vulgar, hiperplasia epitelial, leucoplasia, liquen plano y carcinoma. [Serena-Gomez *et al.*, 2011] Estas deberían ser diagnosticadas según los criterios de la OMS (Tabla 2)

Tabla 2. Criterios usados para diagnosticar displasia según OMS. Tomado de Warnakulasuriya (2008)

CAMBIOS EN LA ARQUITECTURA	CAMBIOS EN LA CELULA
Estratificación epitelial irregular	Cambio en el tamaño nuclear (anisonucleosis)
Pérdida de la polaridad de las células basales	Cambio anormal en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Hiperplasia de células basales	Cambio anormal en el tamaño celular (anisocitosis)
Crestas epiteliales en forma de gota	Cambio anormal en la forma celular (pleomorfismo celular)
Incremento en el número de figuras mitóticas	Aumento del radio núcleo-citoplasma
Mitosis superficiales anormales	Aumento del tamaño nuclear
Queratinización prematura de células solas (disqueratosis)	Figuras mitóticas atípicas
Perlas de queratina entre crestas epiteliales	Aumento en número y tamaño del núcleo
	Hipercromasia

2.5 p16(INK4A) COMO MARCADOR DE LESIONES ORALES ASOCIADAS A VPH

La proteína p16(INK4A) está codificada por el gen supresor de tumores CDKN2A quinasa dependiente de ciclina y esencialmente, un regulador del ciclo celular. p16(INK4A) regula negativamente la proliferación celular mediante la supresión de pRb. La pérdida de p16(INK4A) por delección homocigota del gen, mutación, o hipermetilación se ha demostrado en variedad de tumores incluyendo el 54-82 % de los cánceres de cabeza y cuello. En contraste, los cánceres relacionados con el VPH-16 se caracterizan por sobre expresión de p16(INK4A) como consecuencia de la transcripción de E7. Es así como algunos autores reportan la sobreexpresión de la proteína p16 en un porcentaje hasta del 90% en los carcinomas de cabeza y cuello asociados a VPH AR. [Woo *et al.*, 2013; Agrawal *et al.*, 2013; Darragh *et al.*, 2012]. Se ha observado una fuerte correlación entre la sobreexpresión de p16(INK4A) y el cáncer de oro faringe asociado a VPH y varios autores han sugerido que p16(INK4A) medido por inmunohistoquímica (IHC) puede ser utilizado como un marcador de VPH que se encuentra activo y que colabora en la estratificación de la enfermedad [Ibieta, 2005; Pfister *et al.*, 2011]. Se ha reportado un aumento del 38%, 68% y 82% de la p16(INK4A), con respecto a lesiones clasificadas como displasia leve, moderada y severa respectivamente, indicando que

p16(INK4A) también tiene un alto valor pronóstico [Costello & Plass, 2001; Tsoumpou *et al.*, 2009].

p16(INK4A) es un marcador costo-efectivo y práctico en comparación con otras técnicas. Se indica una sensibilidad del 100% y una especificidad del 76% para lesiones que se asocian al VPH16. [Agrawal *et al.*, 2013]. Se considera un resultado positivo pero focalizado si se encuentran pequeños racimos de células teñidas positivamente en un porcentaje < 25 %, o un resultado positivo y difuso si las células se tiñen positivamente en un porcentaje > 25 % [Kreimer *et al.*, 2005; Bird, 2002]. Estudios recientes reportan una sensibilidad del 83% y una especificidad del 40%, demostrando que de los casos estudiados clasificados como VPH(+) el 83.3%, dio p16 positivo, y de los casos VPH(-), el 56.09% dio p16 positivo [Pathak *et al.*, 2017].

Actualmente, no hay consenso sobre el punto de corte que se correlaciona con la actividad transcripcional del VPH. Sin embargo, se reporta que los tumores con sobreexpresión de p16(INK4A), en más del 75 % de las células, siempre expresan ARNm de E6/E7 [Burgers, 2002].

Algunos estudios no han encontrado una correlación directa entre la sobre expresión de p16(INK4A) y el desarrollo de carcinoma de oro faringe VPH(+), cuestionando la actividad oncogénica del p16(INK4A) [Jones *et al.*, 2001], mientras otros estudios han reportado la sobre expresión de p16(INK4A) en pacientes jóvenes con carcinoma escamocelular de cabeza y cuello VPH(-) [Wade, 2001; Harris *et al.*, 2001]. Esto evidencia que aun no es clara la relación directa entre la infección por VPH, la sobre expresión de p16(INK4A) y la carcinogénesis sugiriendo que podría ser causada por la exposición concomitante de otros factores de riesgo como el tabaco [Ibieta *et al.*, 2005]. Estas discrepancias han llevado a recomendar una interpretación cuidadosa de los resultados a la luz de diversas consideraciones clínicas y técnicas [Nakao, 2001; El-Naggar & Westra, 2012].

la IHC con p16(INK4A) del epitelio escamoso, puede marcar la región nuclear de apariencia fuerte y continua o marcar el núcleo y haber tinción citoplásmica de la capa de células basales con extensión hacia arriba, que implicaría al menos un tercio del espesor epitelial. La tinción nuclear focal o irregular no es específica y se puede ver con metaplasia escamosa reactiva, así como la enfermedad de bajo grado NIC 1 en cáncer de cervix. Todos los demás patrones de tinción citoplasmática, descritos como única, tenues, las células individuales, encharcada, dispersos, y otros, se definen como negativo. Los fragmentos pequeños, cortes tangenciales, de

libre flotación, células individuales y otros pueden dar lugar a interpretaciones más subjetivas y variables, pero en tales casos, el mínimo sería que todas las células en cuestión sean fuertemente manchadas y morfológicamente ya están bajo consideración en el diagnóstico diferencial de una lesión precancerosa [Darragh *et al.*, 2012].

En tumores definidos como p16 / VPH (+), la supervivencia a los 5 años es comparable con la de los pacientes que son doblemente negativo, demostrando que este grupo (p16 / VPH +) representa una entidad clínica distinta, más sensible a quimio y radioterapia y responden mejor a los tratamientos que el grupo negativo [Gravitt, 2005; Weineberger *et al.*, 2009].

2.6 METILACIÓN DEL ADN EN CANCER

La patogenia del cáncer incluye mecanismos genéticos y epigenéticos entendiendo por "epigenética" cualquier alteración de la expresión génica, potencialmente hereditaria, que no se acompaña de ninguna modificación en la secuencia del ADN y que aparecen en estadios precoces del cáncer sin necesidad de mutaciones previas a su desarrollo [Sharma *et al.*, 2010; Pereiro, 2013]. Dentro de las mas estudiadas está la metilación del ADN cerca de los sitios de inicio de la transcripción de los genes (hipermetilación aberrante) evento que suprime la expresión génica y tiene un papel fundamental en la transformación maligna de las lesiones precancerosas conllevando al silenciamiento de genes supresores de tumores y a la sobreexpresión de oncogenes [Feinberg *et al.*, 2006; Chen, 2006; Lechner *et al.*, 2013]. El silenciamiento de genes puede darse por dos mecanismos, la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas [Jacobs *et al.*, 1999]. (Figura 4)

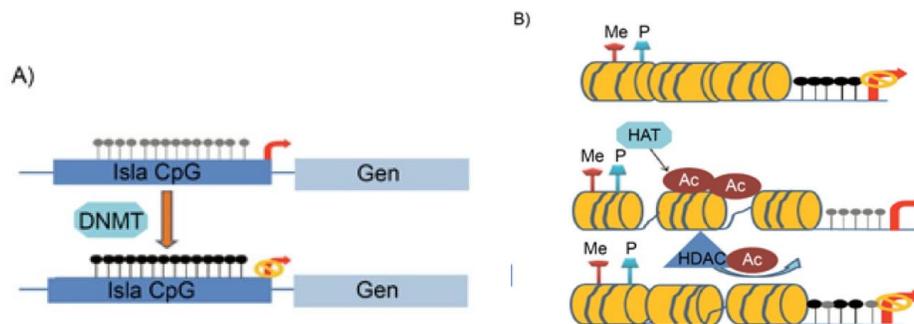


Figura 4 A) Mecanismo de silenciamiento de genes por metilación. Las enzimas de la familia DNMT metilan sitios CpG. Esta metilación está generalmente asociada a la represión transcripcional. En contraste, la desmetilación de estos sitios facilita la expresión génica. B) Mecanismo de apertura y cierre de la cromatina por acetilación y desacetilación de histonas. Las modificaciones de histonas provocan cambios en su interacción con el DNA, lo cual se asocia con la expresión o represión de genes. Tomado de PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462519>

En el genoma de los vertebrados la única modificación epigenética en la molécula del ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN de mamíferos están presentes en los dinucleótidos CpG. En las células somáticas humanas, la 5mC constituye 1% del total de las bases del ADN y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica [Ronco *et al.*, 2008].

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En el 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (> 60% de CG), denominadas "islas CpG". Las islas CpG (CGIs) son regiones del genoma con un alto contenido en G+C y una alta frecuencia de dinucleótidos CpG en relación con el resto del genoma [Gardiner-Garden and Frommer 1987]. Aproximadamente 60 a 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están y son regiones de cromatina abierta que pueden permitir la interacción con el ADN [Cooper & Taggart *et al.* 1983, Bird & Taggart *et al.* 1985]. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas [Tábora *et al.*, 2008].

La metilación del ADN es un proceso dinámico eficientemente regulado, donde las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, explicando que los patrones de metilación de las células resultan de ambas actividades, metilación y demetilación. La metilación es la adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula de ADN y es el principal mecanismo de cambio epigenético. Aquí la metilación consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas (C) situadas previa y contiguamente a una guanina (G), se produce gracias a la acción de enzimas con actividad metiltransferasa que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde un cosustrato, SAM (s-adenosilmetionina), a la posición 5' de la citosina (figura 5).

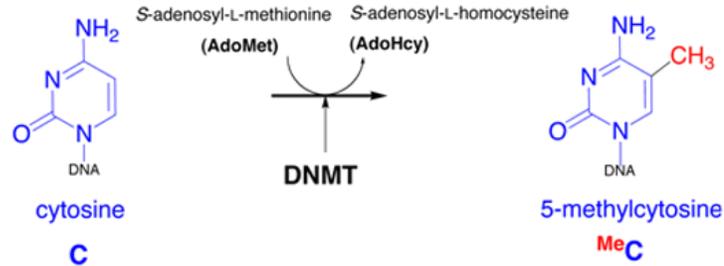


Figura 5: Estructura de la citosina y 5-metilcitosina. Un grupo metilo se transfiere desde un dador, SAM (s-adenosilmetionina), a la posición 5' de la citosina. Tomado de Moison 2013.

Puesto que la metilación es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes, puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca una alteración en la secuencia del ADN. También pueden ser metilados los productos de los genes, es decir, las proteínas regulándose así también su función [Lechner *et al.*, 2013].

La reacción de metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas, que se clasifican en dos grupos, las de mantenimiento (DNMT1) y las de novo (DNMT3A y DNMT3B). Las de mantenimiento ocasionan que el ADN sea metilado al inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular. Las ADN metiltransferasas con actividad de novo, DNMT3A y DNMT3B, adicionan un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado, creando un nuevo CpG altamente hemimetilado. Tanto las DNMT3A y DNMT3B, al igual que la DNMT1, reclutan a las histonas desacetiladas (HDAC) para silenciar genes [Cubie & Cuschieri, 2013].

Se ha sugerido que las DNMT no sólo ejercen su función en la represión transcripcional metilando al ADN, sino que su interacción con las HDAC (histonas desacetiladas) es independiente de la actividad de metiltransferasas. Por otra parte, las DNMT parecen ser dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones proteína-proteína, su asociación con factores de transcripción específicos, proteínas de unión a histonas metiladas o a correpresores como el complejo RB/E2F parecen ser importantes para que su actividad de ADN metiltransferasas participe en la represión transcripcional [Cubie & Cuschieri, 2013].

Aunque los mecanismos responsables de la desmetilación aún no han sido completamente dilucidados, se han propuesto dos posibles procesos para remover los grupos metilo del ADN. Un mecanismo es pasivo y resulta de la ausencia de metilación de mantenimiento durante varios ciclos de replicación del ADN. El segundo mecanismo sugiere la existencia de un proceso activo

de desmetilación, aun cuando existe controversia sobre las características de esta actividad. Se ha reportado que una proteína de unión al ADN metilado (MBD2b) tiene actividad de desmetilasa, también se ha propuesto que la desmetilación activa sea el resultado de un proceso de reparación del ADN, sugiriéndose que una 5-metilcitosina ADN glicosilasa realice esta actividad [Meijer *et al.*, 2009].

Diferentes observaciones apoyan la idea de que los patrones de metilación son mantenidos no sólo por un balance dinámico de actividades de metilación y desmetilación del ADN, sino también por el estado local de acetilación y metilación de las histonas [Tábora *et al.*, 2008].

Al parecer existen dos mecanismos por los cuales la metilación bloquea la transcripción. La 5mC inhibe la unión de ciertos factores de transcripción que contienen secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento como por ejemplo, los factores de transcripción como E2F, CREB, AP2, cMyc/Myn y NFkB, modificándolos. El otro mecanismo es más general e involucra proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores, estos complejos proteicos contienen dominios conservados de unión a ADN metilado denominados MBD, (methyl binding domain) [Stoler & Castle, 2007]. Las proteínas MBD median la interacción entre el ADN metilado y los componentes de la cromatina debido a que son capaces de reclutar complejos represores que incluyen a las desacetilasas de histonas. Las HDAC remueven grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 y parecería que la carga positiva resultante facilita la condensación de la cromatina y limita el acceso de los factores de transcripción a los promotores localizados cercanamente [Stoler & Castle, 2007, Smeets SJ *et al.*, 2007].

Las modificaciones en la estructura de la cromatina incluyen la metilación del ADN y la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de las histonas. Las alteraciones en la estructura de la cromatina, a través de la modificación postraduccional de las histonas tienen consecuencias directas sobre la regulación de la expresión génica. Las modificaciones en los extremos amino terminal de las histonas H3 y H4 tienen una función importante en la producción de los cambios estructurales en la cromatina que regulan la actividad génica [Meijer *et al.*, 2009; Smeets SJ *et al.*, 2007].

El estado de acetilación de las histonas es regulado por la actividad de las histonas acetil transferasas (HAT) y de las histonas desacetilasas (HDAC). La acetilación de las histonas H3 y

H4 normalmente incrementa la expresión de genes promoviendo una estructura abierta de la cromatina. Co-activadores transcripcionales como p300 y PCAF funcionan como HAT. Los residuos de lisina K4 y K9 de H3, además de acetilados, pueden ser metilados. La metilación en K4 y acetilación en K9 se encuentran en cromatina activa, mientras que la metilación en K9 se correlaciona con el silenciamiento de genes [Meijer *et al.*, 2009].

Parece ser que la metilación del ADN no es el mecanismo que inicia el silenciamiento génico, sino que realmente constituye un seguro para mantenerlo. El bloqueo de la metilación del ADN o la ausencia de actividades de DNMT lleva a cambios en el código de las histonas, sugiriéndose que al no poderse unir las proteínas MBD y no reclutar a las HDAC, habría acción de las HAT. Algunos estudios han demostrado que en ausencia de metilación del ADN se produce la metilación en K9 de H3 y el silenciamiento de genes supresores de tumores [Weinberger *et al.*, 2009; Jaenisch & Bird, 2003].

El mecanismo por el que ocurre la metilación aberrante no se conoce. Es posible que estén sucediendo uno de los siguientes eventos: que el ADN metiltransferasa cometa errores al metilar CpGs en "islas" de los promotores de genes de la cadena de DNA recién sintetizada, o con la cadena complementaria sin CpGs metiladas. También es posible que las proteínas de unión a CpGs se pierdan, y de esta manera no protejan estos sitios de ser metilados [Woo *et al.*, 2013].

Un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. En los procesos carcinogénicos de la cavidad oral se ha evidenciado que aquellos carcinomas más agresivos biológicamente muestran una mayor cantidad de vías desreguladas epigenéticamente, dando como resultado una respuesta desfavorable a los tratamientos terapéuticos convencionales [Jithesh *et al.*, 2013]

Diferentes estudios realizados en carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello reportan que la infección por VPH afecta la metilación del ADN, observándose que las regiones hipometiladas de las islas CpG son más propensas a afectar la expresión génica que las regiones hipermetiladas [Degli Esposti *et al.*, 2017]. Se ha demostrado que aquellos carcinomas VPH positivos tienen perfiles de expresión génica diferentes a los VPH negativos y los mecanismos epigenéticos incluyen cambios de metilación del ADN tanto del huésped como del virus, así como modificación de la cromatina en el huésped [Annayanis *et al.*, 2015]

Los estudios realizados en cancer de cuello uterino evidencian que todos los genes supresores de tumores que pertenecen a casi todas las vías del cáncer disminuyen su expresión por hipermetilación, mientras que en lesiones precancerosas la hipermetilación se presenta solo en algunos de los genes, es así como la metilación aberrante del CDKN2A es clara en el cancer y se produce de manera heterogenea cuando apenas se inicia la progresión de la enfermedad, planteandose que la asociación es similar en la progresión de la enfermedad que se desarrolla en cabeza y cuello [Annayanis *et al.*, 2015].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo del carcinoma escamocelular de cabeza y cuello ha sido atribuido a factores de riesgo como el tabaco y alcohol, sin embargo existe un porcentaje de estos carcinomas que se desarrollan en pacientes cuyo factor de riesgo es el VPH. Investigaciones realizadas en las últimas décadas han evidenciado al VPH como un potencial agente carcinogénico de vías aerodigestivas altas que incluyen la cavidad oral [Reuschenbach, 2013. Gillison *et al.*, 2000, Kreimer *et al.*, 2005, Gillison *et al.*, 2014].

El estudio de la asociación entre el VPH con el cáncer bucal, se basa en la alta evidencia de la presencia de este tipo viral en cáncer de cuello uterino, considerándose una infección de transmisión sexual, por lo que las prácticas de sexo oral podrían contaminar la mucosa oral, encontrándose también una asociación con el número de compañeros sexuales [Martín-Hernán *et al.*, 2013].

Se ha reportado que la infección por VPH es adquirida en la adolescencia y que la mayor prevalencia es observada en edades igual o mayor 25 años la cual va decreciendo con la edad. La prevalencia de VPH de genotipos de alto riesgo a carcinogénesis como el VPH 16 y 18 no presenta diferencias en las diferentes regiones geográficas (IARC, 2007). Se ha demostrado la presencia de estos genotipos en lesiones pre malignas de cavidad oral que manifiestan histológicamente algún grado de displasia, así como a carcinoma escamocelular, convirtiéndolo en un factor etiológico para el desarrollo de estas patologías. [Giovannelli *et al.*, 2002].

Jayaprakash *et al.*, en 2011 reportaron un aumento en la detección de VPH-16/18 en lesiones con displasia (OR, 3.29; 95% CI, 1.95-5.53%) y cáncer invasivo (OR, 3.43; 95% CI, 2.07-5.69%) al compararlas con biopsias de tejido normal. Así mismo se ha reportado hasta un 33.3% de VPH de alto riesgo en biopsias de lesiones no neoplásicas [Babiker *et al.*, 2013].

El proceso de la carcinogénesis comprende una serie de cambios que inicialmente son observados en estudios histopatológicos, donde dependiendo de las características histológicas se identificarían los diferentes grados de displasias o las características de un carcinoma in situ o un carcinoma invasivo. Es importante tener en cuenta que la hiperplasia basal/parabasal puede ser histológicamente similar a la displasia leve, pero que la primera es conceptualmente una lesión benigna y la segunda una lesión precursora de bajo grado y esta es incluida en la

clasificación de lesiones pre malignas desde el aspecto histológico [Kambic V, Gale N, 1998. El-Naggar AK, Westra WH, 2012].

Realizar un estudio de inmunohistoquímica para p16 es recomendado cuando el diagnóstico diferencial morfológico con H & E se encuentra entre las lesiones precancerosa moderada a severa, y se debe considerar el resultado positivo de p16 para categorizar la lesión como precancerosa. (Darragh *et al.*, 2012). La presencia de la proteína p16 es un importante marcador de transcripción activa del virus y también tiene un alto valor pronóstico para clasificación por severidad en tumores de cabeza y cuello [Costello & Plass, 2001].

La carcinogénesis se asocia a alteraciones genéticas y epigenéticas acumuladas en la célula y que permiten un crecimiento no regulado de ésta. Los cambios genéticos van acompañados de cambios en la secuencia del ADN y conllevan a la presencia de mutaciones en genes claves que participan en la regulación del ciclo celular, proliferación y angiogénesis, mientras que los fenómenos epigenéticos están asociados a factores de riesgo como el tabaco, el alcohol y el VPH y no se acompañan de cambios en la secuencia del ADN, sin embargo, representan un papel clave en la transformación maligna de las lesiones precancerosas, conllevando al silenciamiento de genes supresores de tumores y a la sobreexpresión de oncogenes [Lechner *et al.*, 2013].

La metilación del ADN es considerada el principal mecanismo de cambio epigenético, es un evento temprano de la carcinogénesis y conlleva al silenciamiento de los genes. [Lechner *et al.*, 2013]. En la actualidad muchos estudios han observado las alteraciones en la metilación de los diferentes estadios del cáncer. Dichas alteraciones pueden aparecer antes de su inicio, en células premalignas o durante la progresión del tumor, y participar en la severidad y/o en el grado de malignidad. En cavidad oral no se han reportado datos precisos sobre esta asociación, lo que hace importante hacer más observaciones en lesiones premalignas que se asocien al VPH para aclarar estas suposiciones.

Esta investigación busca evaluar el papel del virus del VPH en la modulación del epigenoma, y la severidad de las lesiones precancerosas de cavidad oral y dejar planteados nuevos estudios de identificación de genes alterados por metilación del ADN, que puedan ser utilizados como nuevos biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de pacientes como factores pronósticos para recurrencia y transformación maligna.

4. JUSTIFICACION

Se ha demostrado que la infección por VPH ha venido aumentando así como la prevalencia de tumores en cavidad oral asociados a los genotipos de alto riesgo del virus, en pacientes no consumidores de tabaco ni alcohol. Un gran número de reportes apoyan la hipótesis de que los genotipos de alto riesgo específicos de VPH juegan un papel importante en la patogénesis de las lesiones potencialmente malignas de la cavidad oral, de manera que para la clínica es relevante el esclarecimiento del papel del VPH en relación a la evolución del cáncer oral.

La gran mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y aunque un pequeño porcentaje de los pacientes desarrollan una infección persistente, es ésta la que se puede asociar al desarrollo del cáncer, lo que hace importante identificar la modulación del epigenoma por la infección para poder establecer a futuro, biomarcadores adecuados que pueden predecir y diferenciar una infección por VPH transitoria de una infección persistente.

Se considera que el VPH tiene la capacidad de inducir la transformación maligna de las células epiteliales, principalmente por la integración del virus en los genomas de la célula huésped y la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, lo cual induce la inmortalización y transformación celular.

Este trabajo busca identificar si la infección por el VPH genera cambios epigenéticos relacionados con la metilación del ADN en lesiones premalignas de cavidad oral, que sean diferenciales entre las lesiones VPH (+) de alto riesgo y las lesiones VPH (-).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la metilación del ADN asociada al VPH en lesiones precancerosas de cavidad oral.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1 Evaluar la sobreexpresión de p16INK4a en lesiones potencialmente malignas de cavidad oral.

5.2.2 Identificar y genotipificar el virus del VPH en lesiones potencialmente malignas de cavidad oral

5.2.3 Establecer los cambios diferenciales en la metilación del ADN en lesiones precancerosas entre el grupo VPH (+) p16(+) y el grupo VPH (-) p16 (+).

6. METODOLOGIA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de corte transversal

6.2 POBLACION MUESTRA

Bloques de parafina de biopsias recibidas en el servicio de patología oral de la Universidad El Bosque y del laboratorio de patología Citopat de la ciudad de Bogotá, durante los años 2013 a 2015.

Se evaluaron un total de 40 muestras con diagnóstico clínico de lesión precancerosa y diagnóstico histopatológico de displasia epitelial, se clasificaron 3 grupos según el diagnóstico histológico en (1) displasia leve, (2) displasia moderada y (3) displasia severa y otro grupo con diagnóstico de hiperplasia epitelial. A todas las muestras se les realizó Inmunohistoquímica para evaluar positividad de p16CDKN2A. Luego se les realizó identificación y genotipificación de VPH para elegir los 3 grupos de estudio para las librerías de datos así: grupo 1 (n=4) muestras con diagnóstico de displasia, VPH(-) p16(+), grupo 2 (n=4) muestras con diagnóstico de displasia VPH(+) p16(+) y grupo 3 (n=4) muestras con diagnóstico de hiperplasia epitelial VPH(-) p16(-) (figura 6).

6.3 METODOS Y TECNICAS PARA LA RECOLECCION DE LA MUESTRA

6.3.1 Criterios de inclusión:

- Tener como diagnóstico clínico una patología potencialmente maligna según criterios de la OMS
- Tener como diagnóstico Histopatológico con H&E algún grado de displasia según criterios de la OMS
- Tener patrones de tinción para p16CDKN2a (Se tomaron como p16(+)) Todos los patrones de tinción citoplasmática, descritos como única, tenues, de células individuales, encharcada, dispersos, y otros, según Darragh *et al.* en el 2012)

6.3.2 Criterios de exclusión:

- Tejido insuficiente en los bloques
- No tener los datos clínicos completos
- Paciente fumador según historia clínica

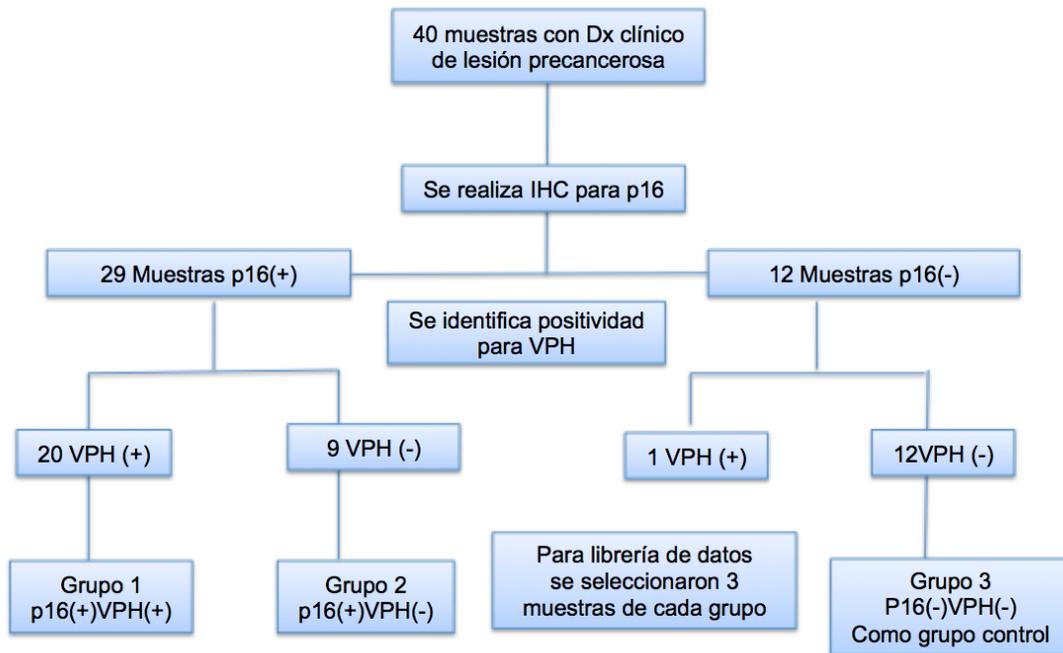


Figura 6. Flujo grama de diseño, selección y exclusión de muestras de lesiones potencialmente malignas

6.4 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P16 POR INMUNOHISTOQUIMICA

A los bloques seleccionados se les realizó lectura histopatológica por 2 patólogos orales para confirmar diagnóstico del grado de displasia según los criterios de la OMS. A todas las muestras se les identificó la positividad o tinción de p16 por inmunohistoquímica mediante CDKN2A (p16) (Bond III, Leica Microsystems, INC, Buffalo Grove, IL, EEUU) y se identificó la positividad o tinción de p16, utilizando un control positivo (de lesión cancerosa) y los parámetros de positividad por Kostopoulou en el 2011 (Figura 7) y teniendo en cuenta los patrones de tinción citoplasmática, tenues, de células individuales, encharcada y dispersos, como lo describe Darragh *et al.* en el 2012. Las muestras se consideraron positivas a pesar de no tener el mismo patrón de tinción que el control positivo, teniendo en cuenta que se utilizaron muestras con

diagnostico de displasia leve y moderada, que el tamaño de biopsia en cavidad oral no supere un tamaño de 1cm de tejido y que probablemente no hay una alta carga viral.

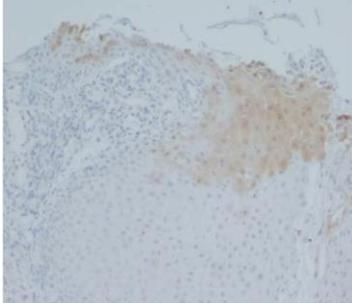
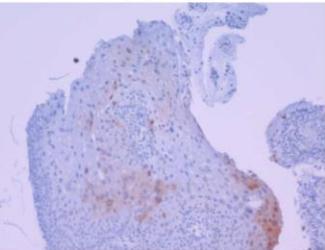
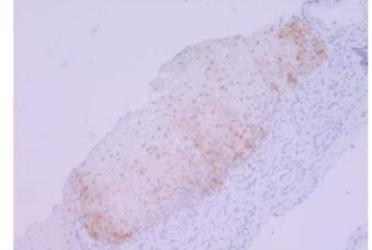
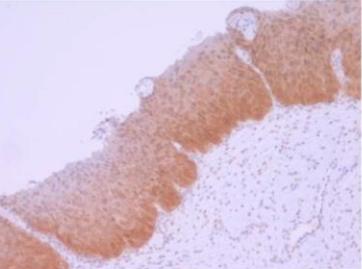
Negativo	No hay ningún marcaje	
Positividad focal		
Positividad focal en parches		
Positividad difusa		

Figura 7. *Inmunohistoquímica patrón positivo en parches y patrón positivo focal (Kospokolou, 2011)*

6.5 EXTRACCION DE ADN Y POSITIVIDAD DE VPH

A todas las muestras se les realizó extracción de ADN utilizando el DNA Extraction kits GE. Healthcare Inc, teniendo en cuenta el protocolo de extracción de ADN para bloques de parafina (Anexo 1)

Se evaluó la calidad del ADN de las muestras obtenidas por PCR en tiempo real utilizando cebadores dirigidos a B-globina. La cuantificación del ADN se realizó en el Nanodrop evaluando la calidad del ADN obtenido, la pureza y la cantidad de ADN por microlitro de la solución final.

Posteriormente se evaluó la presencia de VPH en las muestras por PCR en tiempo real utilizando la pareja de cebadores GP5+/6+ que reconocen la secuencia L1 de VPH. Como control positivo se utilizó ADN obtenido de células HeLa y SiHa para VPH 18 y 16 respectivamente. (Anexo 2)

6.6 GENOTIPIFICACION DE VPH POR LUMINEX

Aquellas muestras positivas para VPH se les realizó PCR Multiplex con los cebadores BSGP5+/GP6+. Se utilizaron nueve cebadores BSGP5+ a 200 nM y 3 cebadores anti-sentido 5'-biotinilados-BSGP6+ a 400 nM para amplificar un fragmento de ~150 pb del ORF viral L1, como también cebadores adicionales (MS3/MS10) para amplificar el gen β -globina el cual se utilizó como control de integridad del ADN.

El ensayo de hibridación múltiple Luminex® permitió la detección de genotipos de VPH; de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,56, 58, 59, 66, 68; intermedios: 26, 53, 67, 70, 73, 82; y de bajo riesgo: 6, 11, 30, 43, 44 y 69. La genotipificación se realizó en el laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBU) de la Universidad Nacional.

6.7 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE BISULFITO REDUCIDA Y REPRESENTATIVA (RRBS)

Para la realización de las librerías genómicas de secuenciación RRBS se utilizó el kit EpiNext™ High-Sensitivity Bisulfite-Seq Kit (Illumina) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Anexo 3). Se prepararon librerías en un total de 12 muestras (4 por cada uno de los grupos) clasificados así: Grupo 1: p16(+) VPH (+), Grupo 2 p16(+) VPH (-), Grupo 3 o grupo control: p16(-) VPH (-).

La técnica de secuenciación de bisulfito RRBS, requiere el tratamiento previo del ADN con la enzima de restricción MspI que reconoce sitios CCGG fragmentando el ADN y enriqueciendo las muestras en islas CpG. Además, el ADN se trata con bisulfito sódico para hacer la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos, y las citocinas metiladas no sufren ninguna modificación como lo muestra la figura 8. La reacción en cadena polimerasa PCR amplifica los fragmentos seleccionados de ADN, donde las citocinas no metiladas convertidas en uracilo, amplifican como timinas mientras que las citocinas metiladas amplifican como citocinas. Este

tratamiento convierte un fenómeno epigenético en una diferencia genética y en consecuencia, analizable mediante diferentes técnicas.

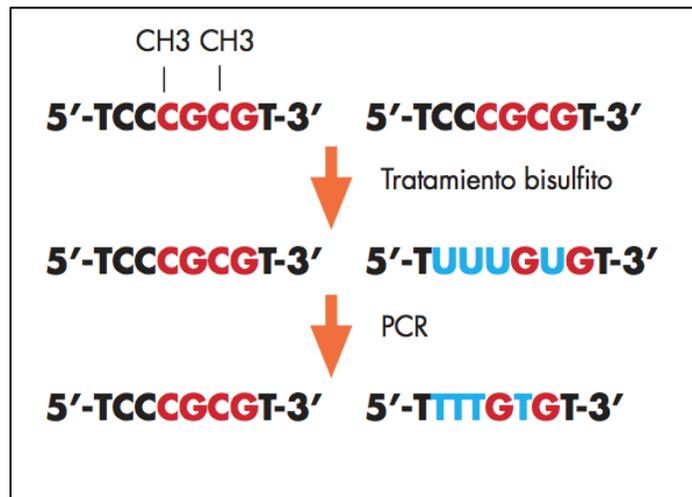


Figura 8. *Tratamiento con bisulfito sódico. El bisulfito sódico consiste en una reacción química de deaminación en la que las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas (indicadas con el grupo metilo -CH3) permanecen como tales. Tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los uracilos son substituidos por timinas. (Tomado de F. Balaguer y L. Moreira 2010).*

La calidad de las librerías preparadas fue evaluada utilizando un Agilent® Bioanalyzer®. Se evaluaron los fragmentos de las librerías que deben tener la distribución de tamaño correcta entre 150 y 300 pb sin adaptadores ni dímeros adaptadores. La cantidad de biblioteca indexada se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit.

Se realizó una secuenciación por bisulfito de nueva generación de lectura única "single read". En total se secuenciaron 3 muestras por condición a evaluar, cada una con su réplica experimental en distintas líneas del equipo HiSeq

Una vez estandarizada la técnica para realizar la librería genómica para RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) se hizo el análisis de los datos utilizando el equipo Qubit® del laboratorio de Investigación UGRA de la Universidad El Bosque. La tabla 3 evidencia el adaptador utilizado por cada muestra.

Tabla 3 Secuencia de los adaptadores por muestra

Muestra		TruSeq Adapter
1	44252 Index-7	5/- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATC- s-T-3/
2	53805 Index-7	5/- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATC- s-T-3/
3	1490 Index-8	5/-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC
4	B-32 Index-1	5- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
5	B-71 Index-2	5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATC-s-T-3'
6	B17-13 Index-1	5- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
7	B-35 Index-9	5/- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATC- s-T-3/
8	B-42 Index-11	5/- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CCGATC- s-T-3/
9	B-65 Index-12	5/- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATC- s-T-3/

La figura 9 describe los pasos de preparación de las librerías genómicas y los pasos del análisis bioinformático realizados para llegar al perfil de metilación de las lesiones precancerosas evaluadas. Una vez realizada la librería genómica para RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing), Se seleccionaron 9 muestras que cumplieron con los criterios de calidad para

secuenciación NGS (Next generation sequence), de la siguiente manera: Grupo 1 VPH (+) p16(+) n=3, Grupo 2 VPH (-) p16(-) n=3, Grupo 3 VPH (-) p16(-) n=3.

6.8 LIBRERÍA GENOMICA Y ANALISIS BIOINFORMATICO DEL PERFIL DE METILACION DEL ADN POR RRBS

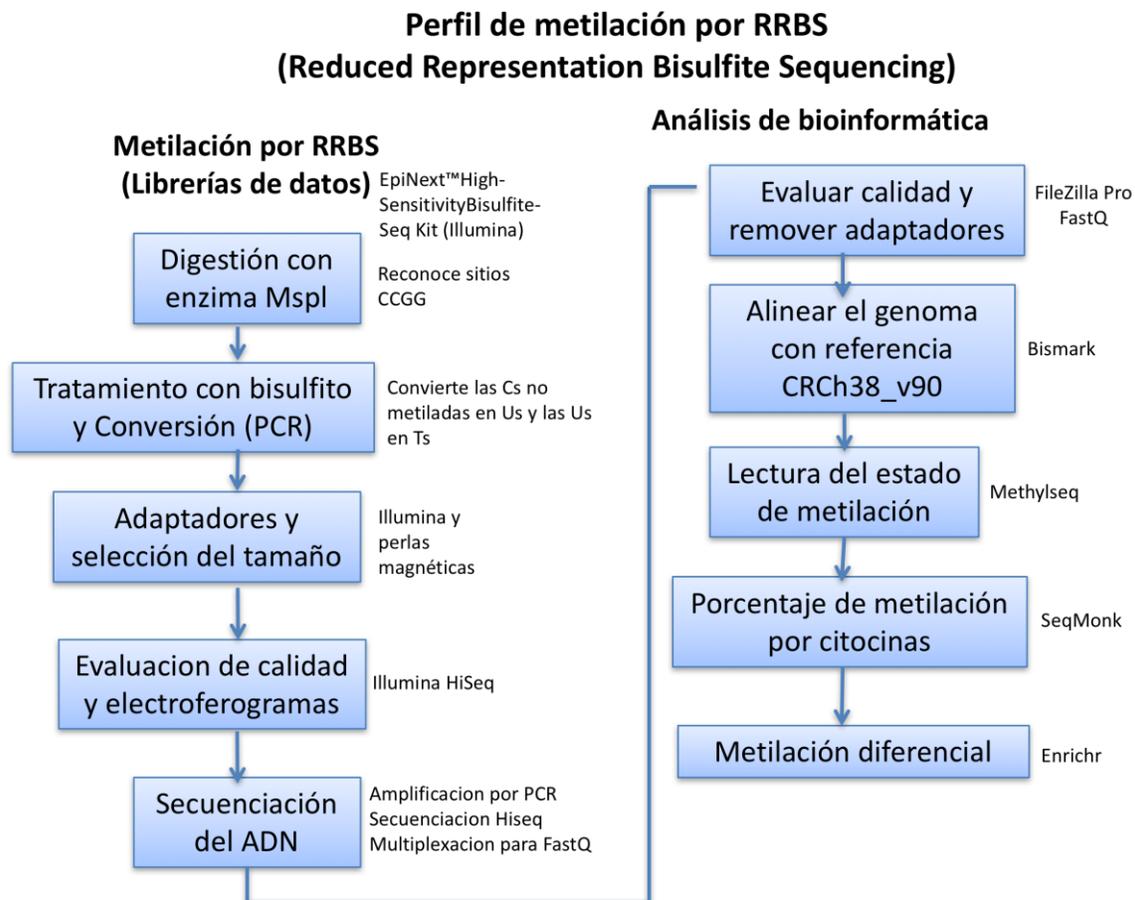


Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de preparación librería genómica y análisis bioinformático de la metilación del ADN.

La secuenciación de las librerías se realizó en el laboratorio de Corpoica y los datos recibidos fueron procesados con el programa FastQ para realizar la limpieza de adaptadores y evaluar la calidad final de cada una de las librerías sin contaminantes. La figura 10 muestra como el programa Fastq arroja los adaptadores utilizados y como se evidencia la limpieza de los mismos.

Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTATGCCGTCT	69849	1.746225	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 50bp)
AGATCGGAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTATG	48100	1.2025	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 49bp)
GAGATCGGAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTAT	31305	0.782625	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 48bp)
TAGATCGGAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTAT	26954	0.67385	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 48bp)
CAGATCGGAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTAT	21762	0.54405	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 48bp)
AAGATCGGAAGAGCACACGCTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTAT	20726	0.51815	TruSeq Adapter, Index 8 (100% over 48bp)

A

B

Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
AACTAA	19770	0.620342138928399	No Hit
ATTAA	18228	0.5719573347691885	No Hit
AATAA	16633	0.521909499079214	No Hit
AATAAA	14759	0.4631072143876702	No Hit
ACCTAA	13968	0.4382872532398521	No Hit
AAAAAAA	10701	0.33577547944728364	No Hit

Figura 10: Secuencia antes (A) y después (B) de la limpieza de adaptadores

Las secuencias obtenidas de RRBS se alinearon con el genoma de referencia metilado GRCh38_v90 (2017-11-06) utilizando el programa bioinformático Bismark (Babraham Bioinformatics), que utiliza el alineador Bowtie y el paquete Samtools para evaluar la calidad del alineamiento con el. Este proceso genera un archivo con extensión.bam que puede ser leído por el programa estadístico R paquete SeqMonk y realizar el llamado de metilación para determinar el porcentaje de metilación por cromosoma por cada muestra completa. Se realiza mapa de calor para visualizar el nivel de metilación. El programa informático Enrichr se utilizó para evidenciar las vías de señalización.

6.9 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS

6.9.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Los resultados fueron centralizados en una base de datos en Excel teniendo en cuenta las variables demográficas, el diagnóstico clínico, diagnóstico histopatológico, positividad de P16CDKN2A y positividad y genotipificación de VPH.

Se realizó estadística descriptiva y se sacaron frecuencias absolutas y relativas de las variables categóricas, y promedios y desviación estándar para variables continuas utilizando el paquete estadístico STATA® versión 11 para Mac con licencia No 30110577246.

6.9.2 ESTADISTICA ANALITICA:

Se realizó prueba de ANOVA para comparación de variables continuas entre grupos y una prueba Chi cuadrado/exacta de Fisher para comparación de frecuencias.

Por análisis de estadística bayesiana se calculó el porcentaje de metilación de cada isla y los datos se correlacionaron con la presencia de VPH y los datos clínicos obtenidos en el archivo de remisión de biopsias. Se realizó análisis de datos por bioinformática para comprobar la naturaleza de los componentes con mayores variaciones (MVP) poder establecer la modulación del epigenoma por el VPH.

6.9.3 ANALISIS BIOINFORMATICO:

Se utilizaron los programas bioinformáticos Bismark (Babraham Bioinformatics), que utiliza el alineador Bowtie y el paquete Samtools para evaluar la calidad del alineamiento con el genoma de referencia, el programa estadístico R paquete SeqMonk para determinar el porcentaje de metilación por cromosoma y el programa informático Enrichr para evidenciar las vías de señalización.

7. CONSIDERACIONES ETICAS

Este proyecto hace parte del proyecto denominado “Prevalencia y caracterización genotípica del virus del papiloma humano en alteraciones potencialmente malignas y cáncer oral en 5 regiones de Colombia. Estudio multicentrico” aprobado con las modificaciones para el presente estudio por el comité de ética de la Universidad El Bosque con fecha 17 de junio del 2014, Acta No 012-2014, (Anexo 4) donde se establece que en el consentimiento informado es claro y explícito que los bloques de las biopsias tomadas podrán ser utilizados para otras investigaciones.

El proyecto describe una investigación científica en seres humanos con un riesgo mínimo que estuvo sujeto a todo lo dispuesto en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Esta investigación tuvo en cuenta los artículos a los que hace alusión dicha resolución en el capítulo I de los aspectos éticos de la investigación en humanos y por las características del estudio que lo clasifica como riesgo mínimo.

El grupo de investigación UIBO se compromete a que la información obtenida de las bases de datos y los bloques de biopsias se guardará en absoluta reserva para el cumplimiento del artículo 8 (Título II, capítulo 1) y sólo será utilizada para los fines estipulados en el estudio.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRAFICAS

La Tabla 4 muestra las características sociodemográficas de 40 pacientes de quienes se obtuvieron muestras embebidas en parafina. El 63% de los pacientes fueron mujeres y el promedio de edad para la población estudiada fue de 55.2 ± 1.7 sin observarse diferencias significativas entre los grupos, $p > 0.05$. El 63% de las muestras corresponden a individuos casados, 30% a solteros y el 22% a divorciados.

Tabla 4 Variables sociodemográficas de la población total

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=9)	Grupo 3 (n=12)	Valor p
	VPH(+)/p16(+)	VPH(-)/p16(+)	VPH(-) p16(-)	
Edad				
Promedio \pm DS	57.1 \pm 2.2	53.5 \pm 3	53.2 \pm 2.5	0.40
Mediana (min-max)	57 (30-82)	53 (35-64)	53 (36-68)	
Genero				
Femenino	11 (55)	8 (89)	7 (58)	0.39
Maculino	9 (45)	1 (11)	5 (42)	
Estado civil				
Casado	12 (60)	5 (56)	9 (75)	0.89
Divorsiado	0	2 (22)	1 (8)	
Soltero	5 (25)	2 (22)	2 (17)	
Union libre	3 (15)	0	0	
*Fuma				
Si	2 (10)	2 (22)	0	0.32
No	16 (80)	6 (67)	9 (75)	
NR	2 (10)	0	1 (8)	
Ocasional	0	1 (11)	2 (17)	

$p < 0.05$ significativo por prueba de ANOVA para comparación de mas de 2 grupos.

*Ningun paciente que reporto ser fumador fue incluido en el estudio

8.2 LOCALIZACION Y DIAGNOSTICO CLINICO DE LA LESION:

El 29.27% de las muestras evaluadas estaban localizadas en la lengua, seguida de la encía en un 24.39% y paladar duro con un porcentaje del 21.45%. En la tabla 5 se observan tanto la localización como el diagnóstico clínico de las lesiones. Se observó una diferencia significativa en cuanto a la localización de la lesión entre los grupos, con un valor $p=0.009$; las lesiones p16(+) se observaron con mayor frecuencia en la lengua, mientras que las lesiones p16(-) sólo mostraron una mayor frecuencia en el paladar y la encía.

Tabla 5 Localización de la lesión y Diagnóstico clínico tomados de los reportes Histopatológicos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Valor p
	VPH(+)p16(+) (n=20)	VPH(-)p16(+) (n=9)	VPH(-)p16(-) (n=12)	
Localización de la lesión	F (%)	F (%)	F (%)	
Carrillo	3 (15)	1 (11.11)	1 (8.33)	
Encia	5 (25)	1 (11.11)	4 (33.33)	
Lengua	7 (35)	4 (44.44)	1 (8.33)	
Paladar	3 (15)	2 (22.2)	4 (33.33)	0.009
mucosa labial	0	1 (11.11)	1 (8.33)	
Reborde alveolar	2 (10)	0	0	
Trigono retromolar	0	0	1 (8.33)	
Diagnóstico clínico				
Eritroplasia	1 (5)	2 (22.22)	0	
Leucoplasia	14 (70)	6 (66.67)	7 (58.33)	
leucoeritroplasia	1 (5)	0	0	0.104
Liquen plano	4 (20)	1 (11.11)	0	
Hiperplasia	0	0	4 (33.33)	
papilomatosis palatina	0	0	1 (8.33)	

$p<0.05$ significativo por prueba de Chi cuadrado/exacta de Fisher

En ambos grupos p16(+) se evidenció la leucoplasia como la lesión mas frecuente con un porcentaje del 70% en el grupo 1 y del 66.67% en el grupo 2, el liquen plano fue la segunda lesión mas frecuente seguida de la eritroplasia y el grupo 3 de control evidencia como lesión mas

frecuente la leucoplasia en un porcentaje de 58.33%, seguido de hiperplasias en un 33.33%. No se observaron diferencias significativas entre grupos para el diagnóstico clínico (Tabla 5).

8.3 DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICOS

La tabla No 6 presenta las características histopatológicas de las 40 lesiones evaluadas. Se evidenció que la mayoría de las muestras tienen un diagnóstico de displasia leve con un porcentaje general del 53.76%, siendo el diagnóstico histopatológico mas frecuente para los 3 grupos, seguida de displasia moderada con un porcentaje para la población general de 31.71%, siendo el segundo diagnóstico mas frecuente para cada uno de los grupos. No se evidencia diferencias significativas entre los grupos frente al diagnóstico histopatológico y el porcentaje de displasias severas fue bajo. Las muestras con diagnóstico de hiperplasia fueron utilizadas en el grupo 3 o grupo control.

Tabla 6 Diagnostico Histopatológico e inmunohistoquímica para p16

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=9)	Grupo 3 (n=12)	TOTAL	Valor p
	VPH(+)/p16(+)	VPH(-)/p16(+)	VPH(-)/p16(-)		
Diagnostico Histopatológico	F (%)	F (%)	F (%)	F (%)	
Displasia leve	12 (60)	5 (55.56)	5 (41.67)	22 (53.76)	0.49
Displasia moderada	6 (30)	4 (44.44)	3 (25)	13 (31.71)	
Displasia severa	2 (10)	0	0	2 (4.88)	
Hiperplasia	0	0	4 (33.33)	4 (9.76)	

$p < 0.05$ significativo por prueba de Chi cuadrado/exacta de Fisher

8.4 IDENTIFICACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA p16 Y GENOTIPIFICACION DEL VPH

La tabla 7 muestra que del total de las muestras 20 (48.7%) fueron identificadas como VPH (+) por PCR, p16(+) por IHC, 21 (51.2%) de las muestras fueron VPH (-), y solo 9 (21.9%) fueron p16(+), para un total de 29 muestras (70.74%) positivas para p16. A través de luminex® se les realizó la genotipificación.

Tabla 7 Relación entre VPH y p16 de las muestras evaluadas

	VPH(+) F(%)	VPH(-) F(%)	No de Casos F(%)
p16(+)	20 (48.7)	9 (21.9)	29 (70.74)
p16 (-)	0	12 (29.2)	12 (29.26)
Total	20 (48.7)	21 (51.2)	41 (100)

La positividad de la inmunohistoquímica para p16 se observa en la tabla 8, evidenciando que la positividad focal es la que se presenta con mayor frecuencia para los grupos 1 y 2. Se observa una diferencia significativa en cuanto a la positividad de p16 en general entre los grupos; es importante tener en cuenta que esta diferencia puede estar dada por el grupo VPH- p16- que no mostró ninguna muestra positiva (figura 11).

Tabla 8. Clasificación de p16 según la proporción histológica del marcaje.

	Grupo 1 (n=20)	Grupo 2 (n=9)	Grupo 3 (n=12)	TOTAL	Valor p
	VPH(+)/p16(+)	VPH(-)/p16(+)	VPH(-)/p16(-)		
Positividad para p16	F (%)	F (%)	F (%)	F (%)	
Negativo	0	0	12 (100)	12 (29.27)	
Positivo en parches	6 (30)	2 (22.22)	0	8 (19.51)	0.000
Positivo focal	14 (70)	7 (77.78)	0	21 (51.22)	

$p < 0.05$ significativo por prueba de Chi cuadrado/exacta de Fisher

En la tabla 9 se identifica el número de casos según el diagnóstico histológico y de acuerdo a cada grupo la presencia de VPH así como de la positividad para p16. Es importante considerar que la mayoría de las muestras evaluadas tienen un diagnóstico histológico de displasia leve, lo que indica que, a pesar de ser lesiones precancerosas en estadios muy tempranos, un alto porcentaje mostró positividad para VPH así como positividad para p16. En cuanto a las displasias moderadas el comportamiento de la positividad para VPH es un 46% de las muestras con

identificación de VPH (+) y un 54% VPH (-), pero la positividad para p16 es del 77%. El grupo de displasias severas reporta que el 100% de las muestras es tanto VPH (+) como p16 (+). No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

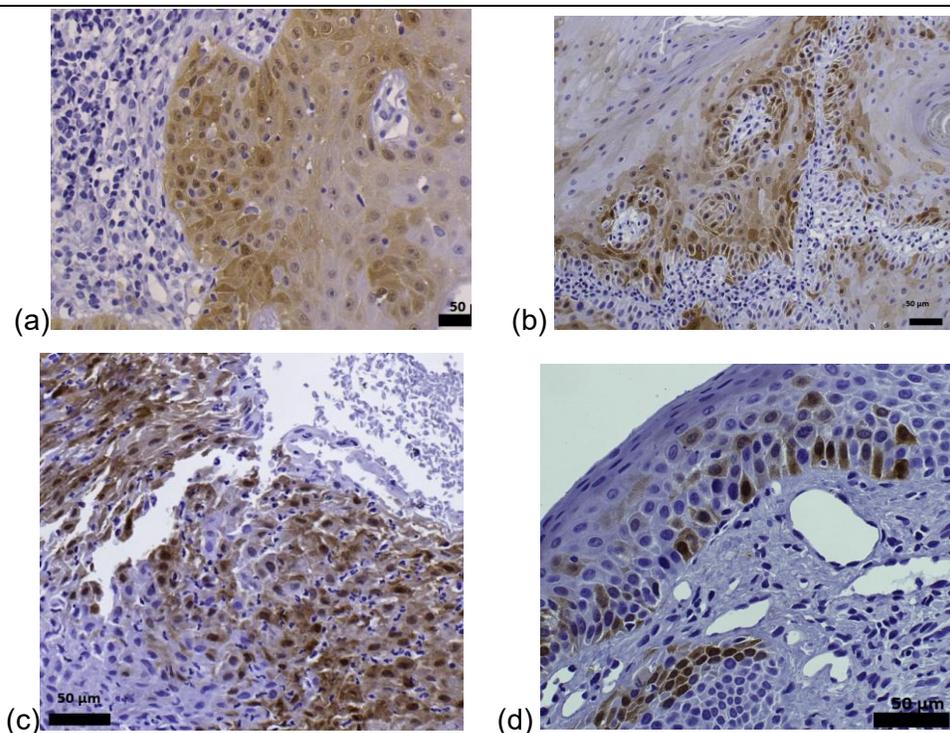


Figura 11 Patron de IHC positiva para p16 obtenido en las muestras: Las figuras (a), (b), (c) y (d) muestran patrones de p16 INK α IHC en lesiones con diagnostico de displasia epitelial VPH(+). (400x), siguiendo los patrones de Kospokolou 2011 se puede describir las figuras (a), (b) y (c) como patrones de positividad en parche y la figura (d) como patrones de positividad focal.

Tabla 9 Relacion entre VPH y p16 según diagnostico histopatologico

	Displasia Leve (n=22)	Displasia Moderada (n=13)	Displasia Severa (n=2)	Hiperplasia (n=4)
VPH (PCR)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)
Positivo	12 (54.6)	6 (46)	2 (100)	0
Negativo	10 (45.4)	7 (54)		4 (100)
p16 (IHC)				
Negativo	5 (22.7))	3 (23)	0	4 (100)
Positivo	17 (77.3)	10 (77)	2 (100)	0

$p < 0.05$ significativo por prueba de Chi cuadrado/exacta de Fisher

8.5 GENOTIFICACIÓN DE VPH DE LAS MUESTRAS EVALUADAS

Dentro de los genotipos de alto riesgo, el que se presenta con mayor frecuencia (80%) es el VPH 16, solamente el 35% de las muestras presentan VPH 18, mientras que los genotipos VPH31 y VPH 45 se presentan en un 50% y 40% respectivamente. También se identificaron como genotipos de alto riesgo el 26, 35, 39, 52, 53, 56, 59, 66, 70, 73 y 82, que sumados se evidencian en el 60% de las muestras. En cuanto a los genotipos de bajo riesgo el más común fue el VPH 11 en el 20% de los casos y el VPH 6 en el 15%, el único genotipo de bajo riesgo diferente que se observó fue el 42 y se presentó en el 10% de las muestras. (figura 12).

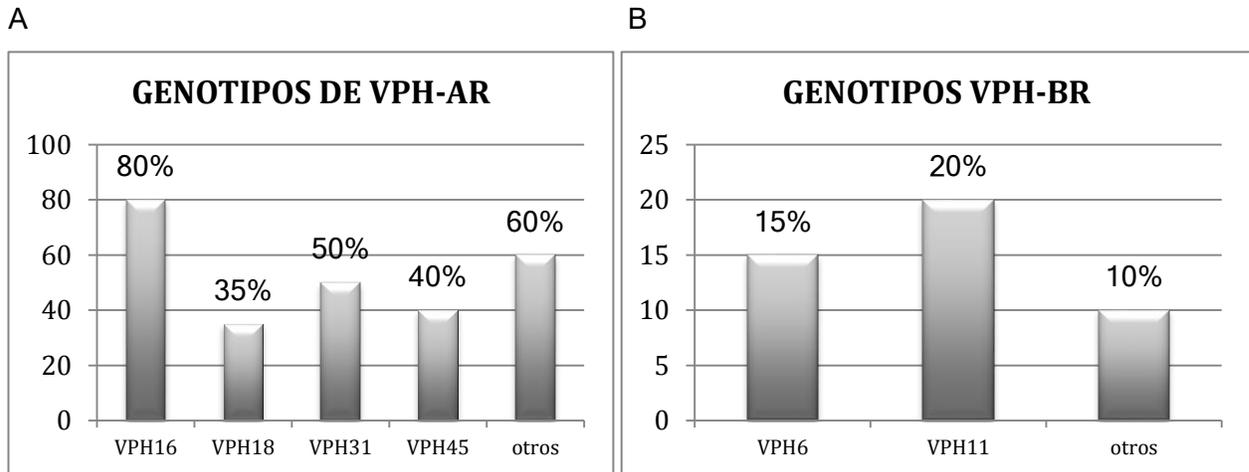


Figura 12. (A) Identificación de genotipos del VPH de Alto Riesgo (B) Identificación de genotipos del VPH de Bajo Riesgo

En general todas las muestras presentaron más de un genotipo viral, incluso algunas muestras llegaron a observarse hasta 12 genotipos virales diferentes.

8.6 OBTENCIÓN DE LIBRERÍAS RRBS PARA SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN (NGS)

La tabla 10 muestra los resultados obtenidos de la concentración de las librerías en el equipo Qubit®

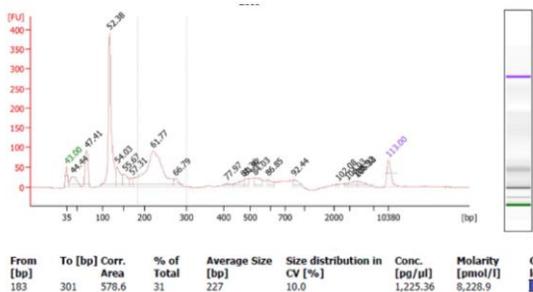
Los electroferogramas (Anexo 5) muestran que las librerías obtenidas tienen una distribución de tamaño esperado entre 189 y 234 pb, con una media de 217.7, una DS de 5.8 (IC 95% 204 a 231), sin adaptadores ni dímeros adaptadores. La concentración estuvo entre 1.2 y 4.73[pg/μL] con una media de 40.23 y una DS de 37 (IC 95% -47.0 a 127). La molaridad entre 4.3 y 16.6, con una media de 14.2 y una DS de 3.7 (IC95% 5.6 y 22.8)

Tabla 10 Concentración en ng/μL de las librerías genómicas RRBS (Qubit DNA HS)

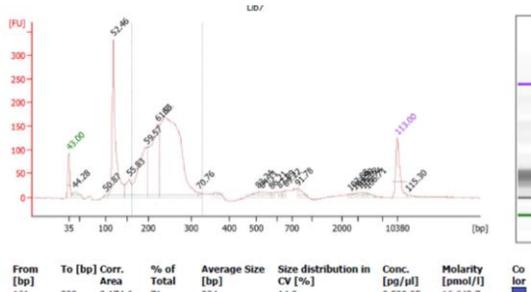
Grupo	Id	Muestra	Tamaño [pb]	Concentración [pg/μL]	Molaridad [pmol/l]
1	1	C-4252	189	4.73	42.3
	2	C-53805	212	1.92	14.7
	3	C-1490	189	4.73	14.4
2	4	B-32-13	227	1.22	8.2
	5	B-71-13	234	2.52	16.6
	6	B-17-13	232	343	4.3
3	7	B-35-12	225	1.45	10.1
	8	B-42-13	227	1.2	8.2
	9	B-65-13	225	1.36	9.3

La figura 13 muestra los electroferogramas obtenidos de las librerías genómicas con la molaridad (pM) del pico esperado en pb así como los datos numéricos observados en la tabla 10.

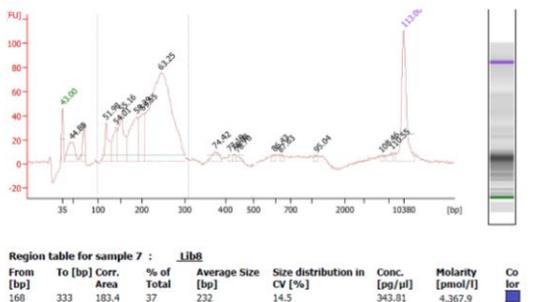
Muestra C-4252 – Grupo 1



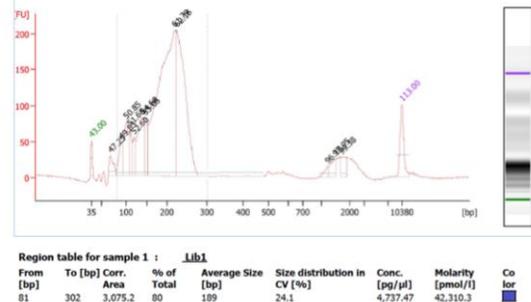
Muestra C-53805 – Grupo 1



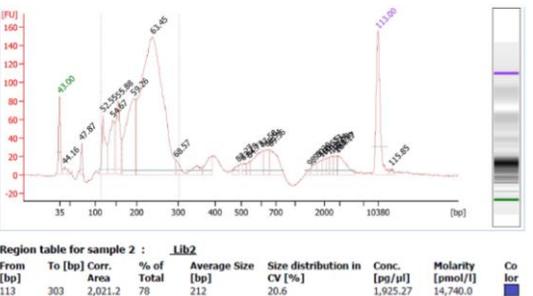
Muestra C-1490 – Grupo 1



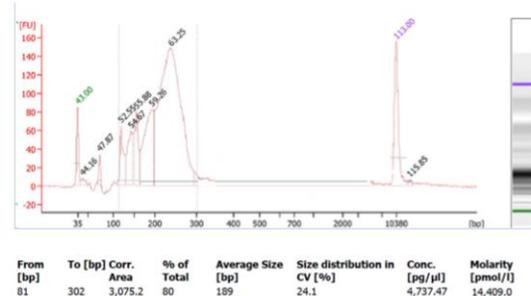
Muestra B-32-13 – Grupo 2



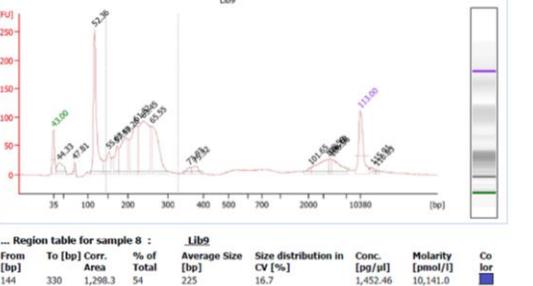
Muestra B-71-13 – Grupo 2



Muestra B-17-13 – Grupo 2



Muestra B-35 – Grupo 3



Muestra B-42-13

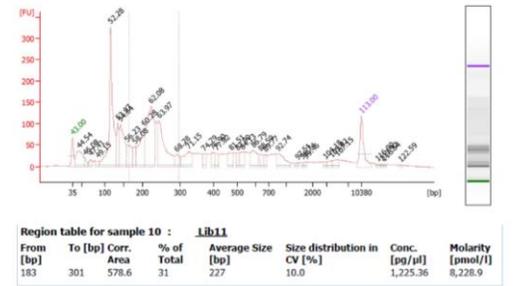


Figura 13: Resultados del control de calidad para las librerías RRBS preparadas a partir de las muestras de ADN de lesiones precancerosas. Se observan los electroferogramas generados por el bioanalizador Agilent de la fracción de la librería esperada por muestra. Las librerías de las muestras B-35 y B-42-13 son de baja calidad.

8.7 SECUENCIACION POR BISULFITO DEL ADN POR RRBS

El proceso de secuenciación RRBS evidenció que la distribución de la calidad de los datos en la escala Phred (Q30-score) para cada una de las líneas estuvo por encima del 80%, lo que sugiere que la precisión en la identidad de nucleótidos tiene una probabilidad de error del llamado individual de las bases de 1 en 1000 (Figura 14).

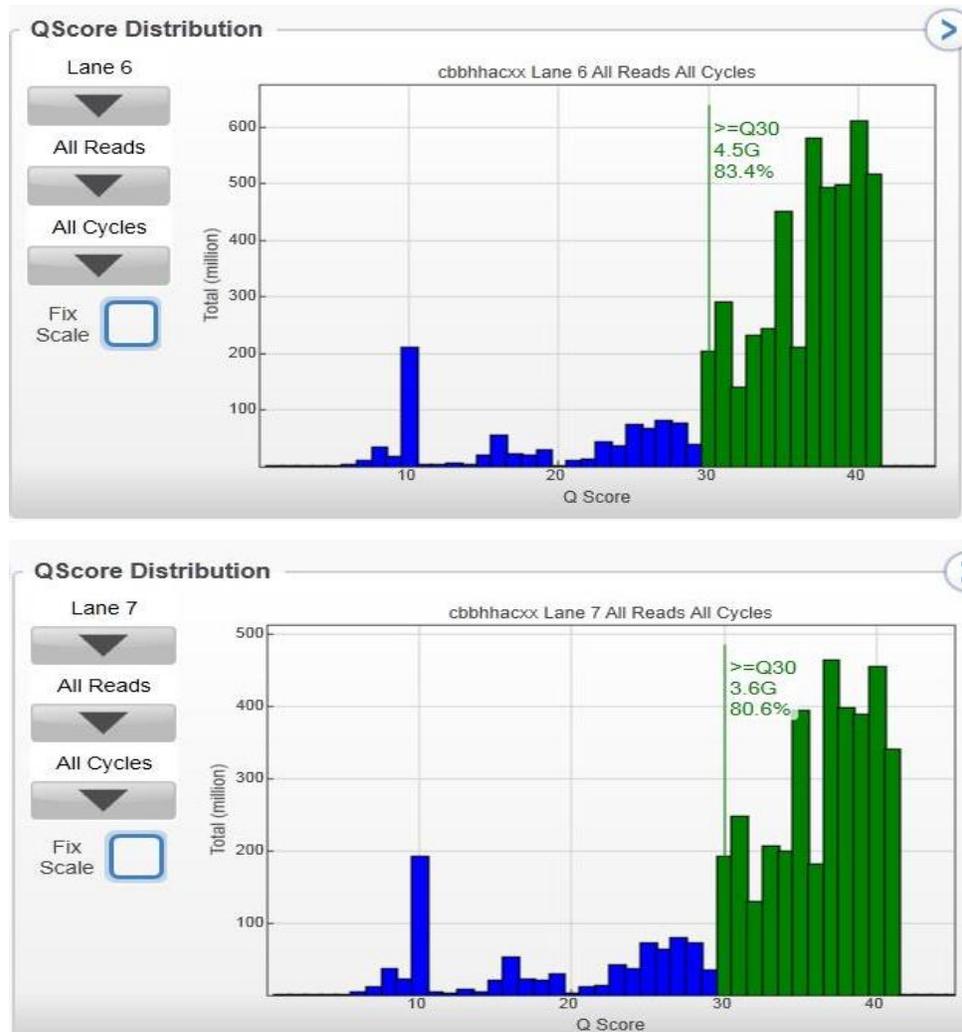


Figura 14: Gráfica Q30 de las lecturas de illumina para cada una de las líneas del Hiseq 6 y 7. La proporción verde del gráfico representa las bases con un puntaje de alta calidad (definido como Q30) identificado durante la ejecución. La secuenciación por bisulfito reducida y representativa (RRBS) tuvo un Q30 de bases = 83,4% y 80,6% respectivamente.

La figura 15 muestra la distribución de las medias de los valores de los datos mediante un diagrama de cajas, en donde la densidad de las líneas 6 y 7 (en las que fueron montadas las muestras del presente estudio) se encuentran entre 400 y 800 k/mm².

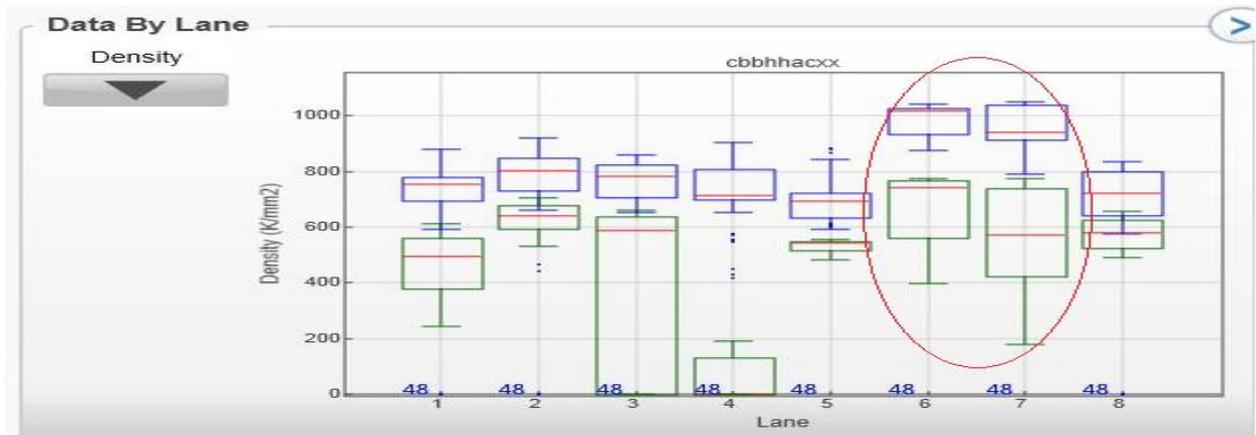


Figura 15: Diagrama de Cajas que representa la distribución de densidad de los datos obtenidos. Las cajas verdes representan los clústeres que pasan el filtro

La figura 16 muestra que el proceso de clusterización en el equipo Cbot fue llevado a cabo, donde se observa una concentración ideal durante el proceso de secuenciación.

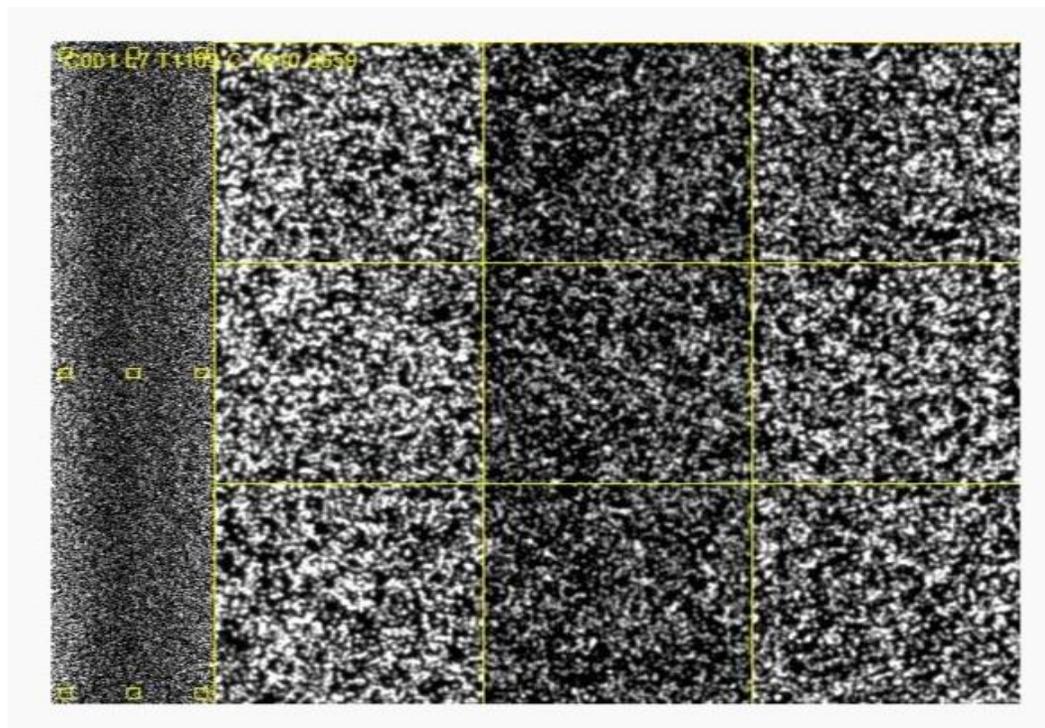


Figura 16: Proceso de clusterización realizado en la corrida

La intensidad de detección de cada una de las bases nitrogenadas durante todos los 57 ciclos de corrida se muestra en la figura 17. La señal emitida se dió entre 2000 a 4000 para guanina y

timina y una señal entre 6000 a 8000 para adenina y citocina; acorde a lo esperado en el proceso de secuenciación.

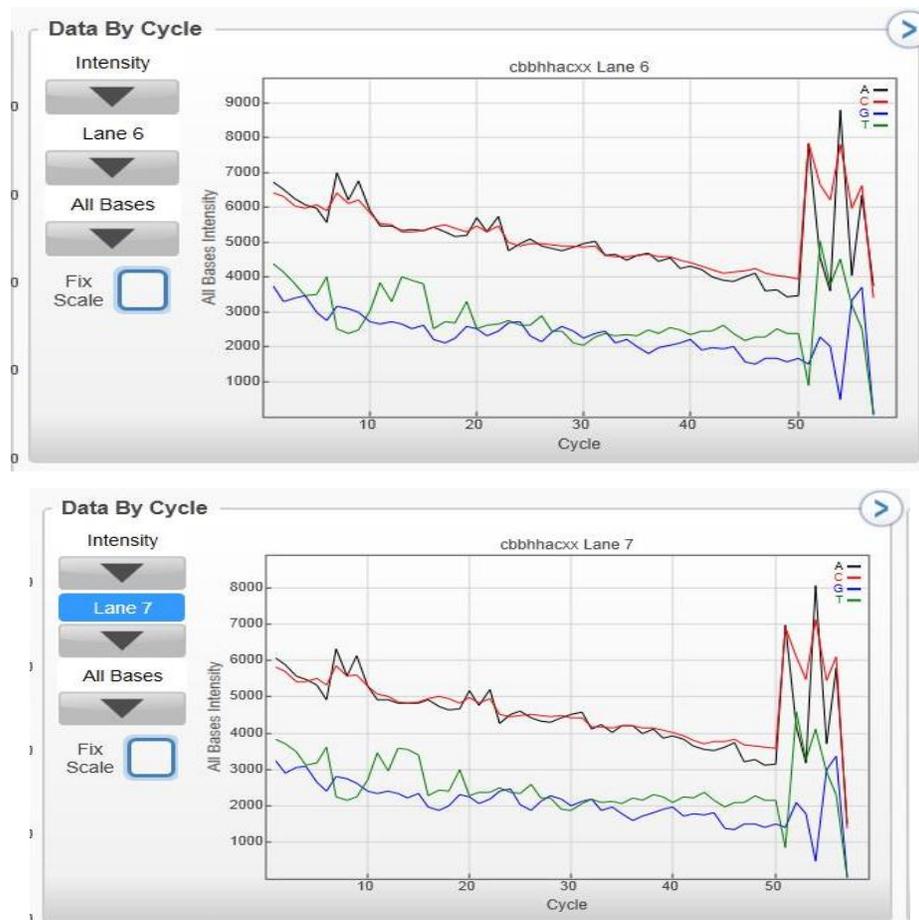


Figura 17: Intensidad de detección de las bases nitrogenadas

Al evaluar las lecturas ya limpias se observa que las muestras de control disminuyeron en un alto porcentaje la calidad de las lecturas teniendo en cuenta que la muestra es extraída de bloques de parafina de varios años atrás, por lo que se decide no compararlas con el gen de referencia, teniendo en cuenta que el objetivo del estudio se basa en la comparación de muestras VPH (+) y VPH (-).

Las longitudes de las secuencias de las muestras seleccionadas se encuentran entre 5 y 50 datos. La tabla 11 muestra el número de pares de bases y el %CG de las muestras VPH (+) y VPH (-) antes y después de haber sido limpiadas.

Tabla 11 Numero de pb y %CG antes y después de la limpieza de adaptadores.

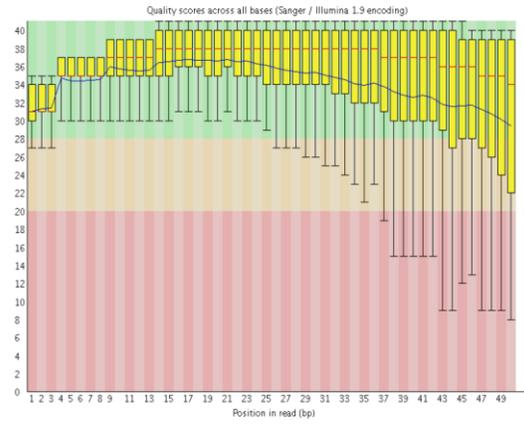
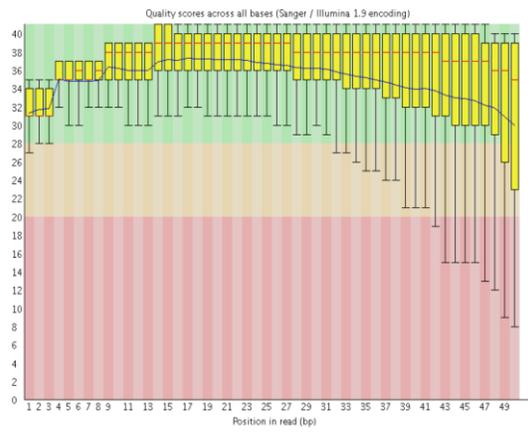
muestra		Línea	secuenciacion	pb	%CG
1	44252	1	inicial	4.000.000	53%
			final	2.857.997	54%
		2	inicial	4.000.000	53%
			final	3.289.337	52%
2	53805	1	inicial	3.732.467	53%
			final	2.329.266	51%
		2	inicial	2899549	53%
			final	1879405	51%
3	1490	1	inicial	4.000.000	50%
			final	318.695	46%
		2	inicial	4.000.000	49%
			final	3.237.720	45%
4	B-32	1	inicial	4.000.000	53%
			final	3.254.598	52%
		2	inicial	4.000.000	53%
5	B-71	1	inicial	1.977.476	53%
			final	1.521.739	51%
		2	inicial	1.340.430	53%
			final	947.328	54%
6	B17-13	1	inicial	4.000.000	52%
			final	2.739.831	50%
		2	inicial	4.000.000	52%
			final	2.773.728	50%

8.8 LIMPIEZA DE ADAPTADORES PROGRAMA FastQ

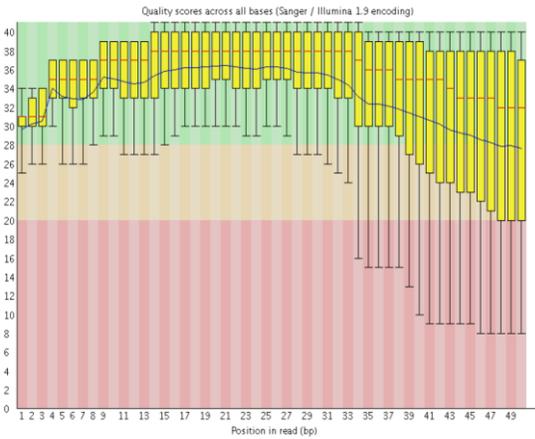
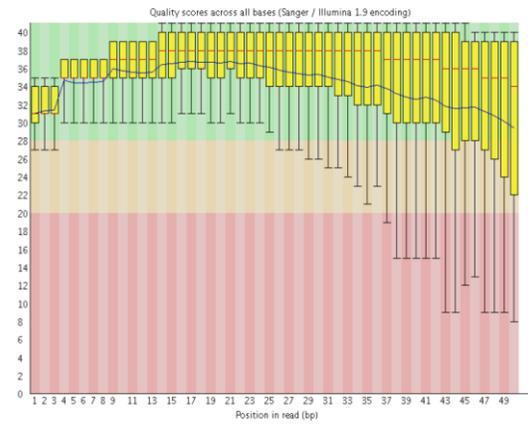
El análisis de la calidad de la secuenciación de cada muestra después de la limpieza de los adaptadores se realizó con la herramienta bioinformática FastQ (Anexo 6). Como se puede observar en la figura 18, la calidad de las bases va disminuyendo conforme se avanza en su posición en pb, debido a que los cebadores se van despegando.

Los colores del fondo dividen el gráfico en muy buena calidad (color verde), calidad razonable (color naranja) y baja calidad (color rojo). Observando que en todos los casos hay bases que caen en la zona de mayor calidad con un Q mayor a 28, y otras en la zona naranja (Q mayor a 20) de calidad intermedia.

Muestra 1440



Muestra 44252



Muestra B-32

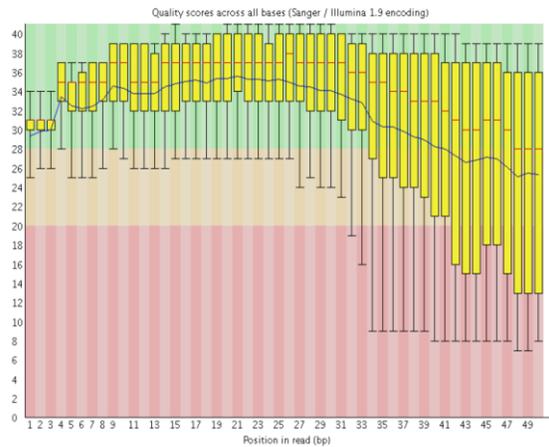
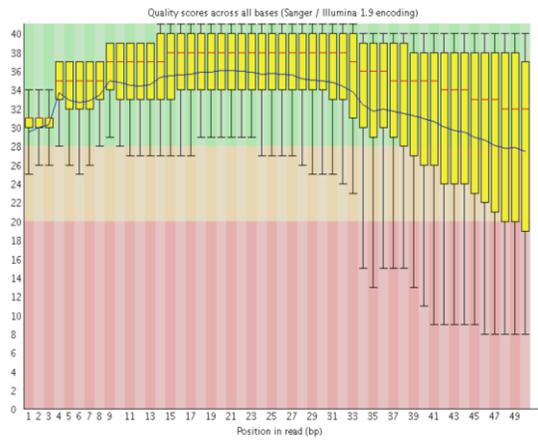
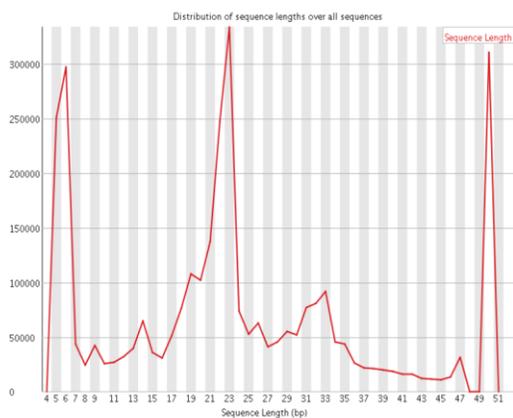


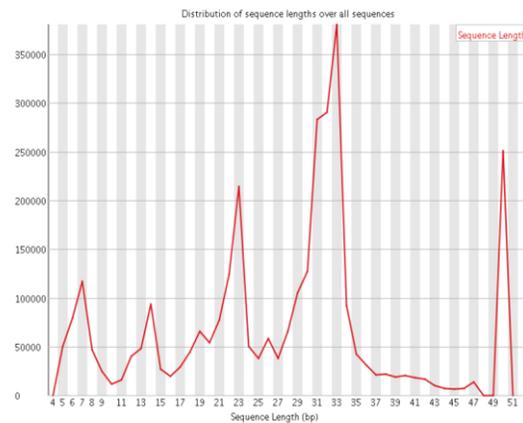
Figura 18. Grafico de calidad de las muestras antes y después de la limpieza de adaptadores que evidencia las variaciones. la disminución normal de la calidad a medida que aumentan los ciclos de secuenciación.

La secuenciación RRBS de las muestras embebidas en parafina genera fragmentos con distribución de tamaños de diferentes longitudes. En nuestro caso, se observa que las secuencias presentan fragmentos predominantemente entre 17 y 45 pb. Son pocos los fragmentos con un tamaño mayor a 45 pb (figura 19).

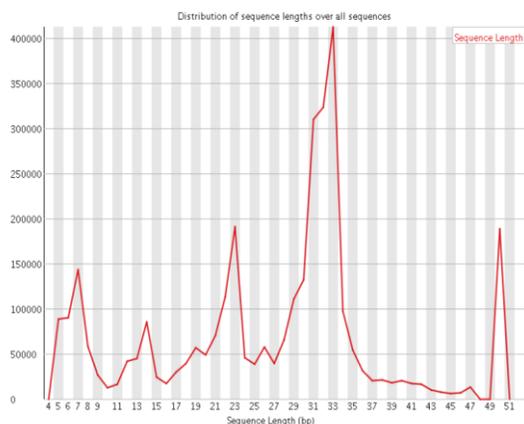
Muestra 1490



Muestra B-32



Muestra 44252



Muestra B-17-13

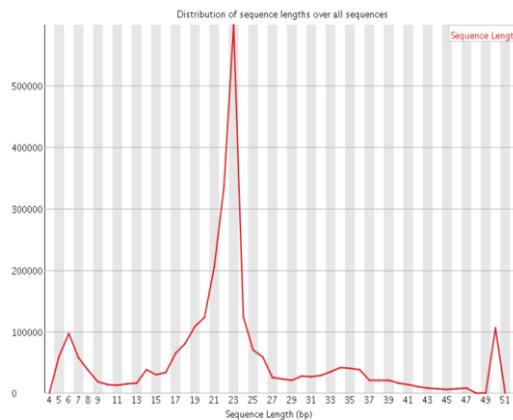


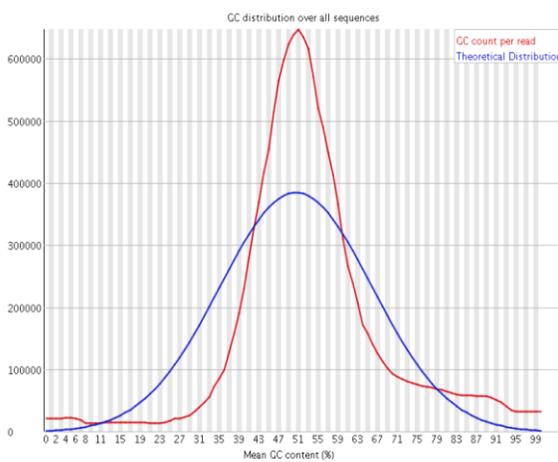
Figura 19. Pares de bases por fragmentos de ADN.

El contenido en guanina y citosina (GC) por secuencia se observa en la Figura 20. Este gráfico mide el contenido de GC de toda nuestra secuencia (línea roja) y lo compara con una distribución normal teórica del contenido de GC (línea azul). Es importante tener en cuenta que durante el proceso de preparación de las librerías genómicas la digestión con la enzima MspI utiliza un patrón de corte $C^A C G G$ que enriquece las muestras en nucleótidos CpG. Este enriquecimiento

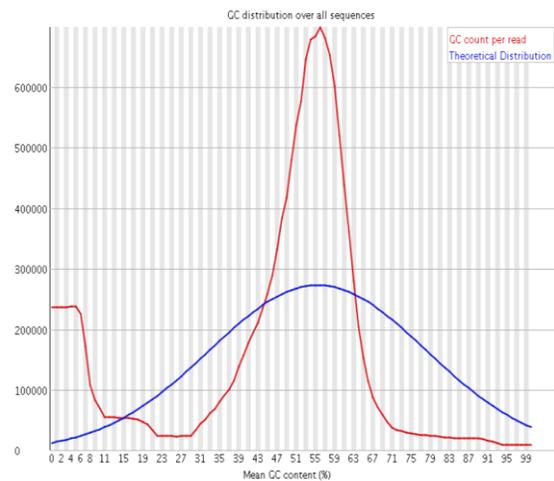
aumenta tanto el porcentaje como el número de lecturas CG comparado con la distribución normal teórica del genoma completo.

La figura 21 evidencian que los adaptadores utilizados para el etiquetado de las librerías de genómicas después de la evaluación de calidad con el programa FasQC quedaron completamente eliminados de las muestras, generando librerías de buena calidad para el posterior análisis bioinformático.

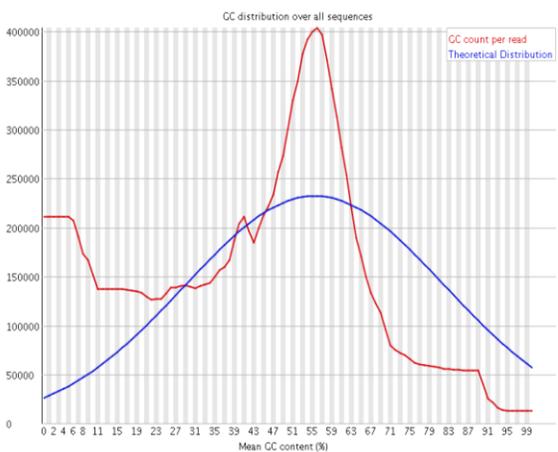
Muestra B-17-13



Muestra 44252



Muestra 53805



Muestra 1490

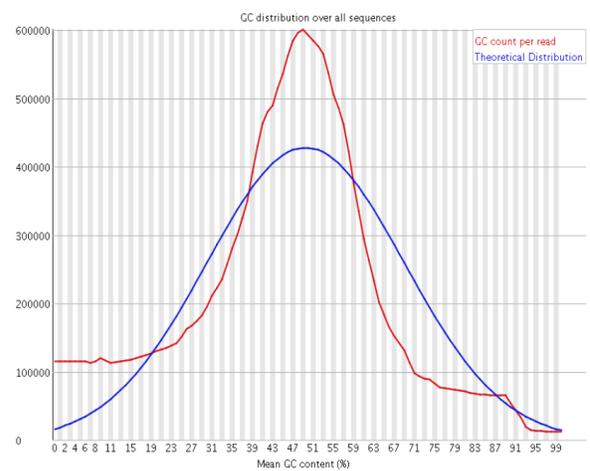


Figura 20. Porcentaje de islas CG comparada con la distribución teórica de islas para cada muestra.

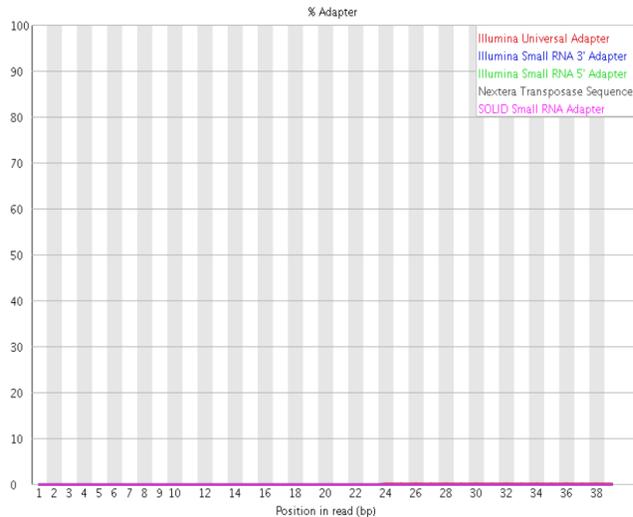


Figura 21: Adaptadores

8.9 VISUALIZACION ANALISIS DE SECUENCIACION CON EL PROGRAMA BIOINFORMÁTICO SeqMonk

SeqMonk es un programa bioinformático desarrollado por Babraham Institute el cual fue diseñado para el análisis de datos de secuenciación mapeados, entonces permite visualizar los conjuntos de datos comparándolos con el genoma de referencia permitiendo encontrar las regiones de interés. Para esto, después de realizar el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia con el programa bioinformático Bismark que genera un archivo con extensión. BAM, las muestras se analizaron en SeqMonk (Anexo 7) permitiendo la visualización de las islas CpG metiladas o no metiladas en las muestras.

Este programa genera la creación de grupos de datos para visualización y análisis, permitiendo la comparación de los datos de metilación en diferentes regiones de cada cromosoma por los diferentes grupos de muestras.

La figura 22 a y b permite la visualización de las islas CpG por cada grupo en los cromosomas 1, 4, 9 y 14 como ejemplos, teniendo claro que el patrón se repite para las diferentes regiones de todos los cromosomas. Mientras se evidencia una diferencia en expresión de islas CpG metiladas entre los dos grupos VPH(+) y VPH(-), es notoria la similitud de la expresión de metilación entre las muestras del mismo grupo.

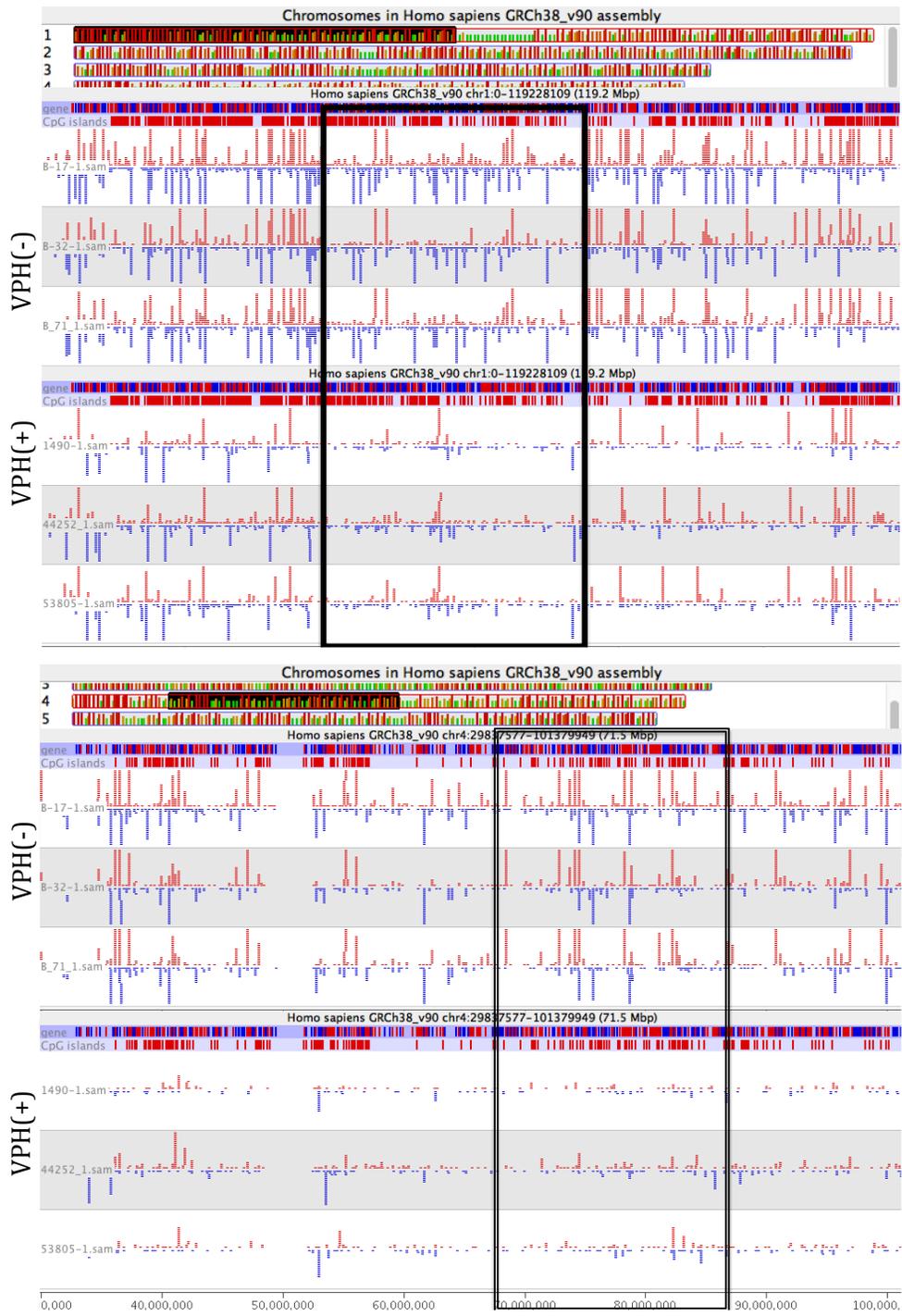


Figura 22a: Comparación de islas CpG metiladas por cromosoma según cada grupo.

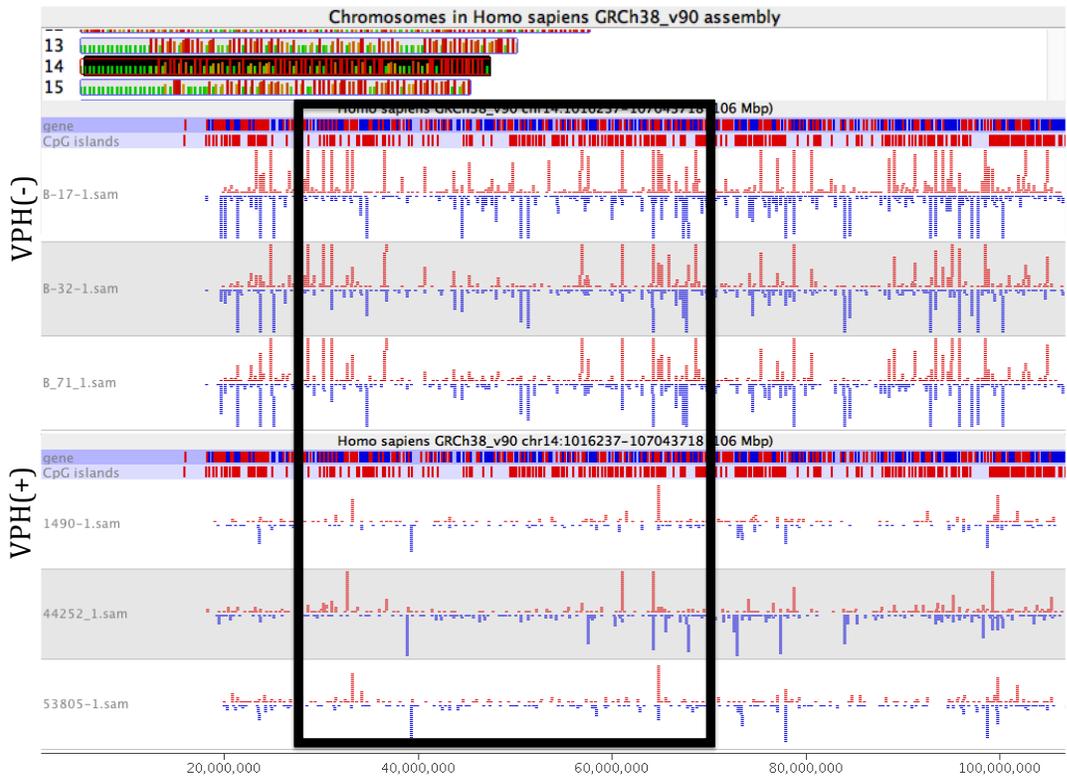
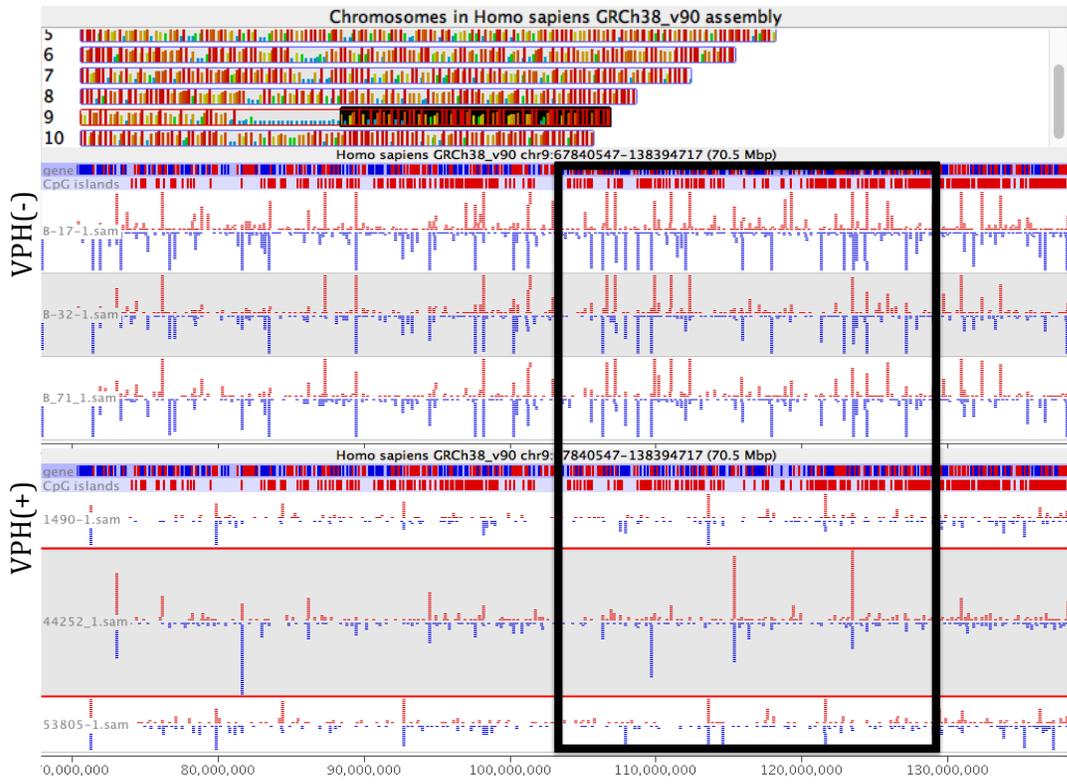


Figura 22b: Comparación de islas CpG metiladas por cromosoma según cada grupo.

Los diagramas cajas y bigotes de la figura 23 permiten observar la reproducibilidad de las lecturas de metilación luego del ensamblaje con el genoma de referencia, además muestra la distribución normalizada de los datos.

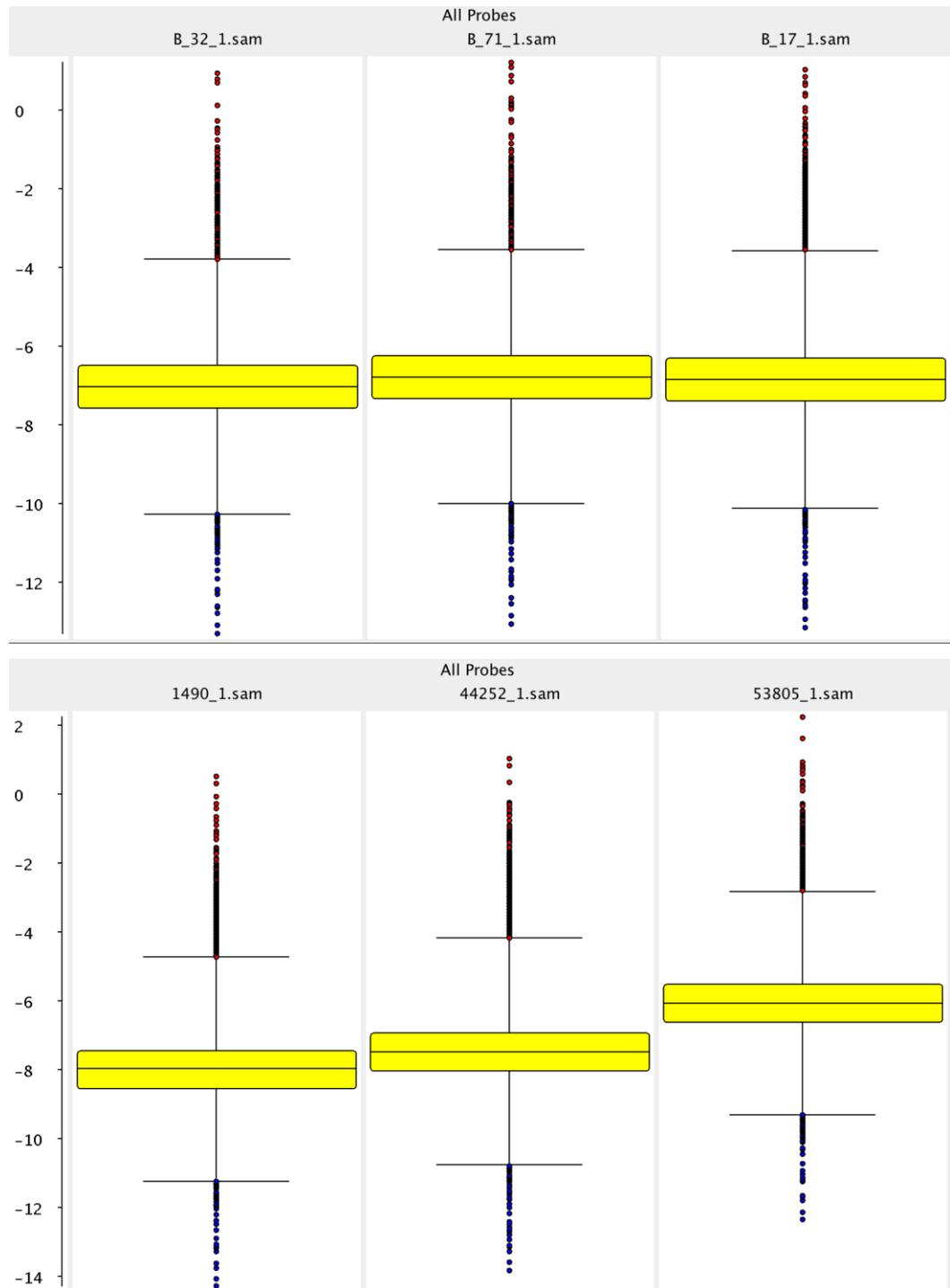


Figura 23: Diagrama de bigotes de las muestras del grupo VPH(-) y el grupo VPH(+) donde se observa la distribución de las islas metiladas

8.10 NIVEL DE METILACION DIFERENCIAL ENTRE LAS MUESTRAS VPH(+) Y VPH(-)

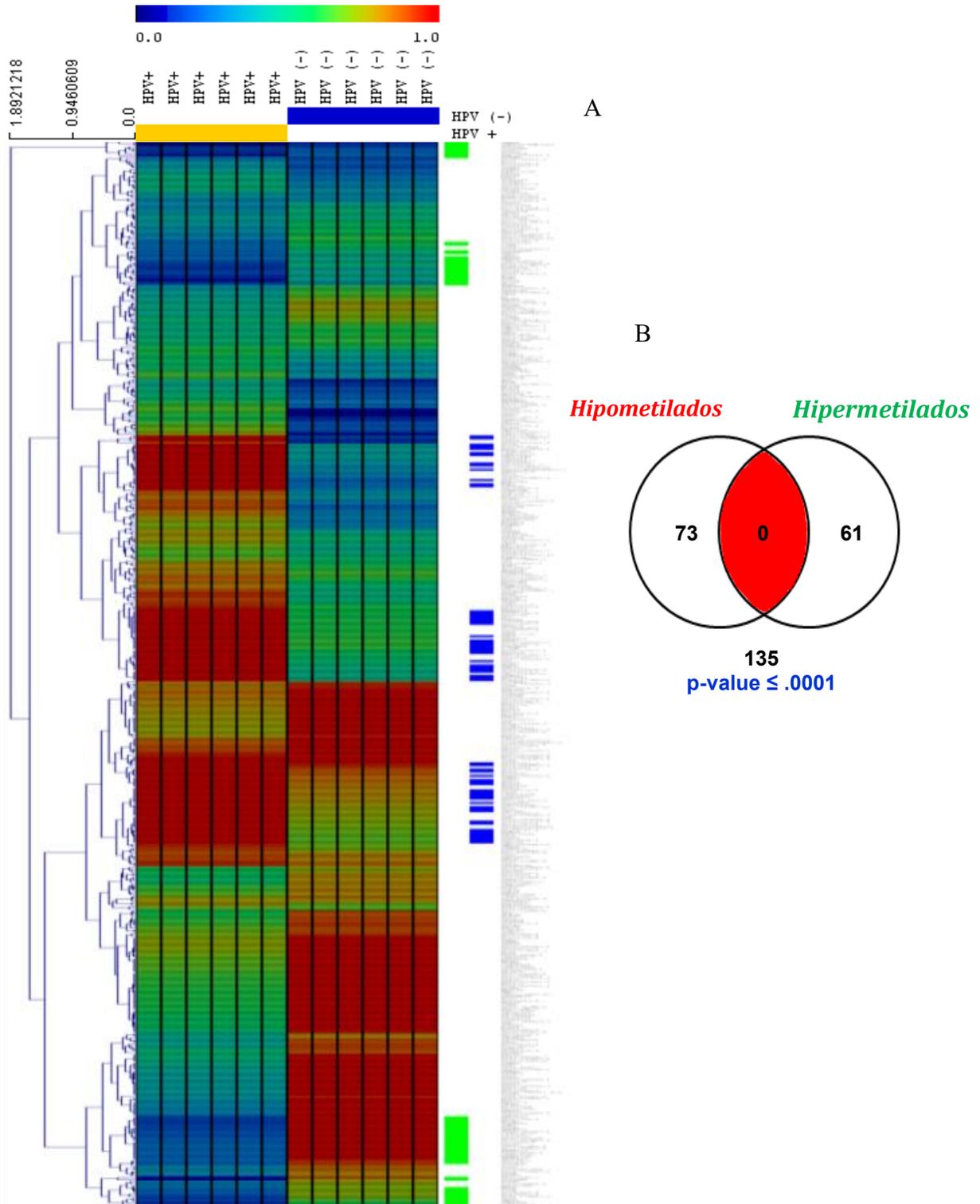


Figura 24. Mapa de calor A. Agrupamiento jerárquico basados en los niveles de metilación de los genes obtenidos por el análisis RRBS en las muestras VPH+ con respecto a las VPH -. B. Diagrama de Venn donde se observan el número de genes hipometilados e hipermetilados significativos en las muestras evaluadas $p \leq .0001$

El mapa de calor de la Figura 24 muestra la representación de los niveles de metilación de los genes que fueron estadísticamente significativos después del análisis bioinformático, en las filas se agrupan los genes y en las columnas las condiciones de los grupos evaluados VPH(+)/p16(+) y VPH(-)/p16(+). Cada nivel de metilación se representa como un cuadrado de color en la posición correspondiente a su gen y su condición. El color depende del nivel de metilación, el verde expresa los genes hipometilados (0% de metilación) y el rojo expresa los genes hipermetilados (100% de metilación). Esto permite evidenciar como el grupo de muestras VPH (+) representadas al lado izquierdo de la figura, tienen un nivel de metilación diferencial con respecto al grupo de muestras VPH (-). Igualmente, el diagrama de Venn muestra los genes hipometilados e hipermetilados diferenciales entre los dos grupos de muestras que son estadísticamente significativos. Los cluster agruparon los conjuntos de genes con un perfil de metilación similar en las condiciones experimentales analizadas

Tabla 12. Numero de genes metilados por cromosomas y Metilacion diferencial por grupo

cromosoma	total citocinas metiladas	numero de genes	% metilacion VPH(+)	% metilacion VPH(-)	valor p
1	257	41	58	63	<i>p</i> ≤ .0001
2	209	24	52	55	
3	111	17	52	53	
4	158	22	58	62	
5	139	24	59	57	
6	169	28	62	66	
7	221	30	57	61	
8	140	18	37	64	
9	231	33	51	53	
10	172	25	61	49	
11	111	17	57	55	
12	203	27	47	64	
13	28	6	65	71	
14	81	12	57	57	
15	98	13	56	77	
16	179	29	46	53	
17	199	30	65	55	
18	92	15	51	53	
19	306	46	50	57	
20	79	15	67	52	
21	55	10	73	47	
22	109	17	67	51	
TOTAL	3347	449			

El análisis de los datos de metilación con el bioinformático Bismark (Tabla 12) permitió comparar los porcentajes de metilación por cada cromosoma entre los dos grupos. (ANEXO 8). Se evidencia que, en 14 de 22 cromosomas, el grupo VPH (+) tuvo niveles mas bajos de metilación comparado con el grupo VPH (-) con una significancia estadística $p \leq .0001$, sugiriendo que la infección por VPH modula el epigenoma de las células infectadas.

La figura 25 muestra una tendencia de islas CpG hipometiladas en el grupo de muestras VPH(+), donde el cromosoma 8 muestra un menor porcentaje de metilación y el cromosoma 21 el mayor porcentaje de metilación para este grupo. El grupo VPH(-) refleja una mayor tendencia a la metilación teniendo menor porcentaje de islas CpG en el cromosoma 21 y el mas alto en el 15. El grafico evidencia que la mayor diferencia en el porcentaje de metilación se encuentra a partir del cromosoma 7, y los valores se invierten para los dos grupos en el cromosoma 21 y 22.

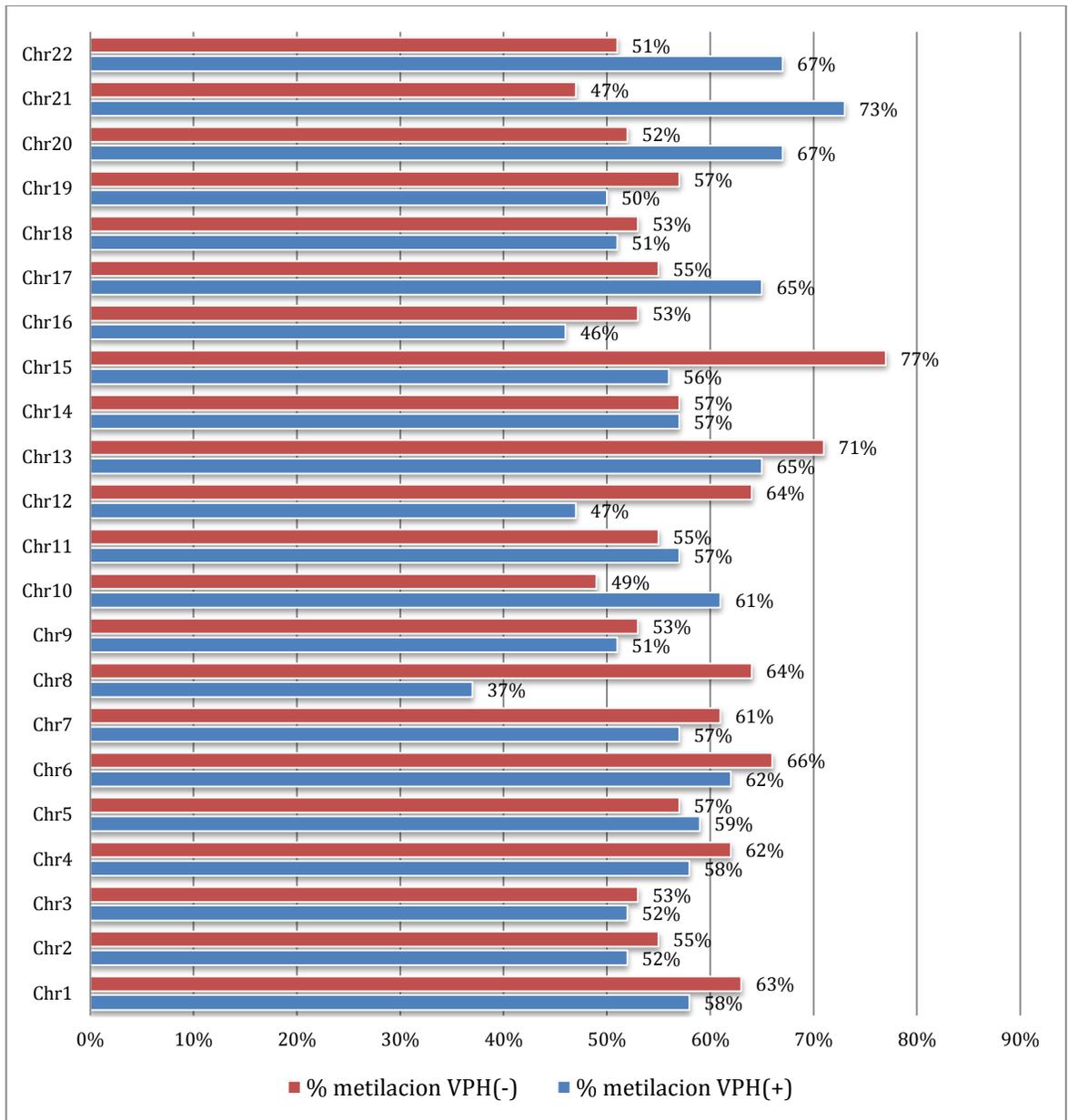


Figura 25: Porcentaje de metilación por cromosoma en cada grupo de estudio

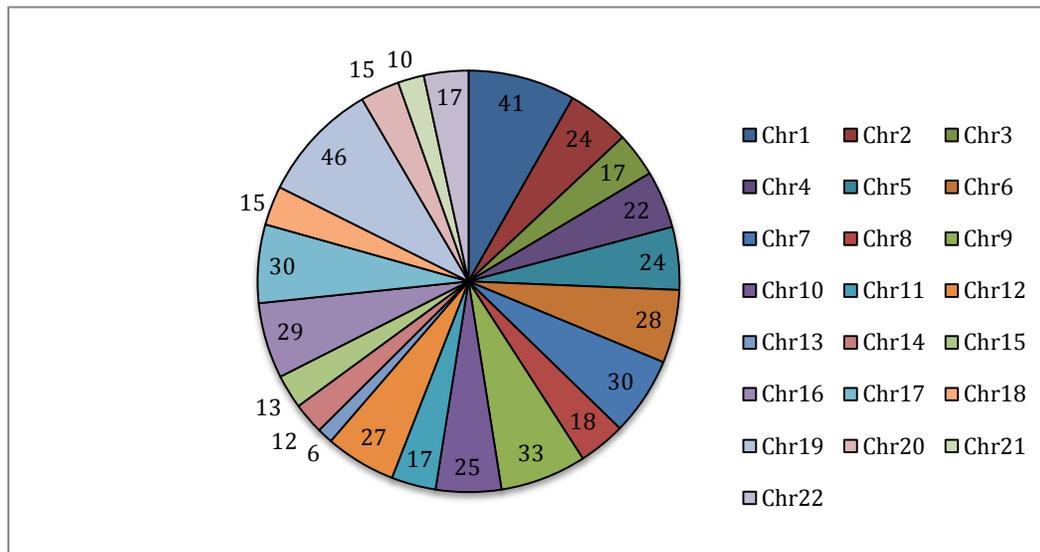


Figura 26: Numero de genes metilados por cromosoma

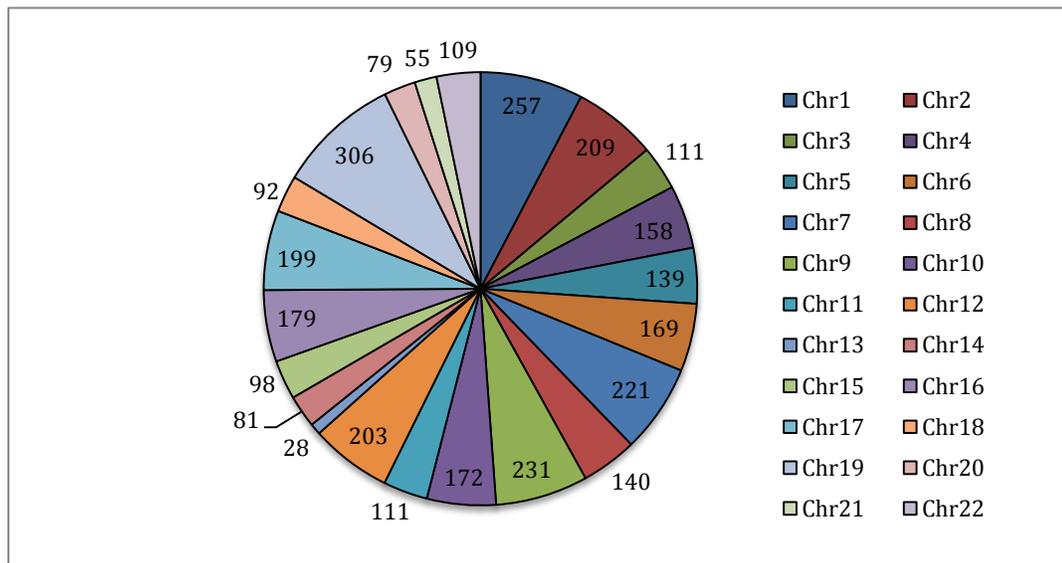


Figura 27: Numero de citocinas metiladas por cromosoma

Las figuras 26 y 27 muestran el numero de genes metilados y el numero de citocinas metiladas por cromosomas, respectivamente. Se evidencia que el cromosoma 19 tiene el mayor numero de genes metilados con un total de 46, siendo igualmente el cromosoma con mayor numero de citocinas metiladas.

El análisis de la ontología génica con el programa bioinformático *Enrich*, que analiza las funciones de los genes y proteínas identificó los términos ontológicos enriquecidos con significancia estadística para el componente celular, función molecular y función biológica, generando gráficas para la visualización de los resultados.

Tabla 13. Componente celular de genes diferencialmente metilados enriquecidos.

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	intermediate filament cytoskeleton (GO:0045111)	0.003909	0.4290	-2.52	13.97
2	cytoskeleton (GO:0005856)	0.006886	0.4290	-2.36	11.75
3	septin cytoskeleton (GO:0032156)	0.006886	0.4290	-2.34	11.65
4	spectrin-associated cytoskeleton (GO:0014731)	0.008479	0.4290	-2.40	11.46
5	cortical cytoskeleton (GO:0030863)	0.008975	0.4290	-2.46	11.62
6	actin cytoskeleton (GO:0015629)	0.03834	0.9106	-2.96	9.66
7	phosphorylase kinase complex (GO:0005964)	0.03925	0.9106	0.65	-2.11
8	meiotic cohesin complex (GO:0030893)	0.03925	0.9106	1.20	-3.89
9	ruffle membrane (GO:0032587)	0.04058	0.9106	-1.97	6.30
10	nuclear meiotic cohesin complex (GO:0034991)	0.04564	0.9106	0.59	-1.81

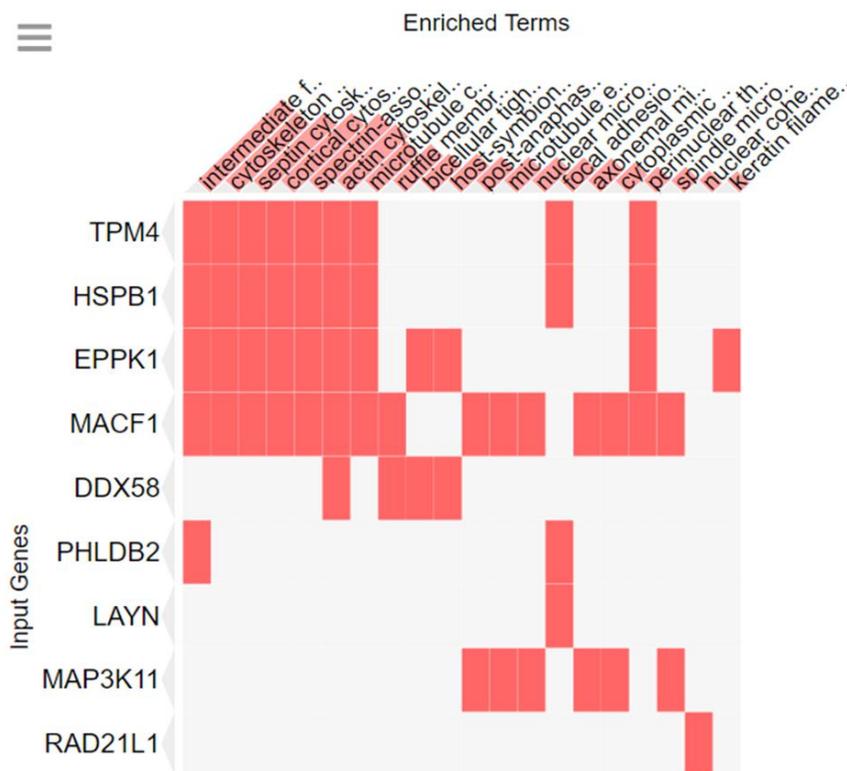


Figura 28. Ontología de los genes diferencialmente metilados según el componente celular. Se muestran los términos enriquecidos según la significancia estadística $p \leq .005$

La tabla 13 y la figura 28 muestran la ontología de los genes que presentan una metilación diferencial entre los dos grupos según el componente celular. Es este caso se evidencia que los componentes celulares involucrados son principalmente proteínas del citoesqueleto, cambios involucrados en 9 genes diferentes siendo los genes con mayor cambio *TPM4*, *HSPB1*, *EPPK1* y *MACF1*.

Tabla 14. Proceso de metilación según genes diferencialmente metilados

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	negative regulation of type I interferon production (GO:0032480)	0.0003141	0.4268	-2.96	23.86
2	positive regulation of interferon-alpha biosynthetic process (GO:0045356)	0.004355	0.4911	-3.32	18.05
3	positive regulation of interferon-alpha production (GO:0032727)	0.005284	0.4911	-2.94	15.41
4	regulation of interferon-alpha production (GO:0032647)	0.005591	0.4911	-3.13	16.24
5	regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	0.007710	0.4911	-3.17	15.44
6	positive regulation of interferon-beta production (GO:0032728)	0.008170	0.4911	-2.81	13.51
7	protein localization to nuclear periphery (GO:1990139)	0.008485	0.4911	-3.31	15.79
8	protein localization to nucleoplasm (GO:1990173)	0.008485	0.4911	-3.29	15.69
9	protein localization to Mmi1 nuclear focus complex (GO:1902666)	0.008485	0.4911	-3.27	15.61
10	protein localization to condensed nuclear chromosome (GO:1903084)	0.008485	0.4911	-3.27	15.59

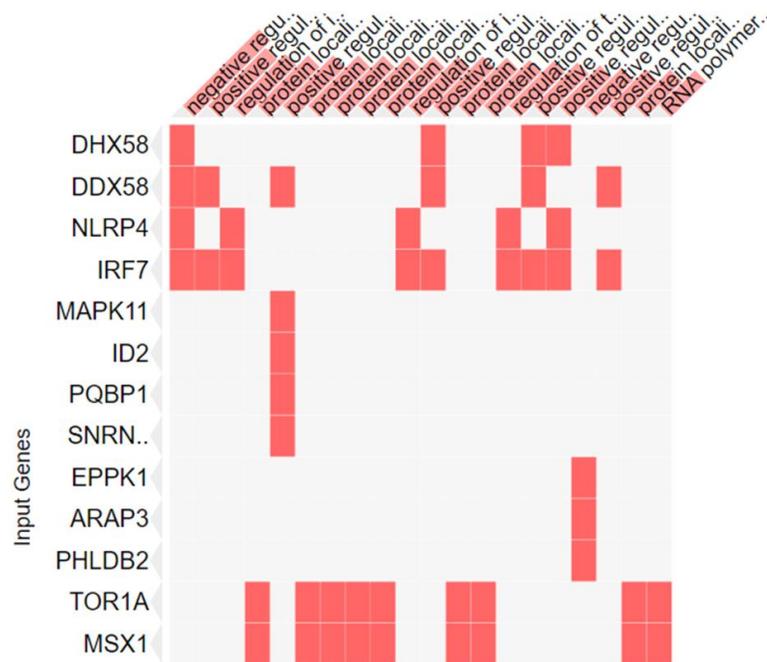


Figura 29. Ontología de los genes diferencialmente metilados según el proceso. Se muestran los términos enriquecidos según la significancia estadística $p \leq .005$

La tabla 14 y figura 29 evidencian los genes diferencialmente metilados de acuerdo a procesos de regulación negativa y positiva del interferón alfa y beta, así como de proteínas localizadas en la periferia del núcleo y el nucleoplasma. Los genes que presentan mayor diferencia son genes del sistema inmunológico asociados a interferones como *DHX58*, *DDX58*, *NLRP4*, *IRF7*, *TOR1A*, *MSX1* entre otros y se encuentran metilados en un mayor porcentaje en el grupo VPH (-) comparados con el grupo VPH(+).

Tabla 15. Función molecular de genes diferencialmente metilados

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	steroid receptor RNA activator RNA binding (GO:0002153)	0.01911	0.4120	-1.87	7.39
2	poly-purine tract binding (GO:0070717)	0.01911	0.4120	-1.86	7.36
3	poly-pyrimidine tract binding (GO:0008187)	0.02263	0.4120	-1.88	7.11
4	inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase activity (GO:0052658)	0.03925	0.4120	-0.80	2.60
5	intermediate filament binding (GO:0019215)	0.03925	0.4120	-0.79	2.54
6	double-stranded miRNA binding (GO:0098851)	0.04212	0.4120	-2.06	6.51
7	potassium-transporting ATPase activity (GO:0008556)	0.04564	0.4120	-1.13	3.50
8	CTPase activity (GO:0043273)	0.04564	0.4120	-1.05	3.23
9	cytidine diphosphatase activity (GO:0036384)	0.04564	0.4120	-0.89	2.74
10	spermine transmembrane transporter activity (GO:0000297)	0.04564	0.4120	-0.88	2.71

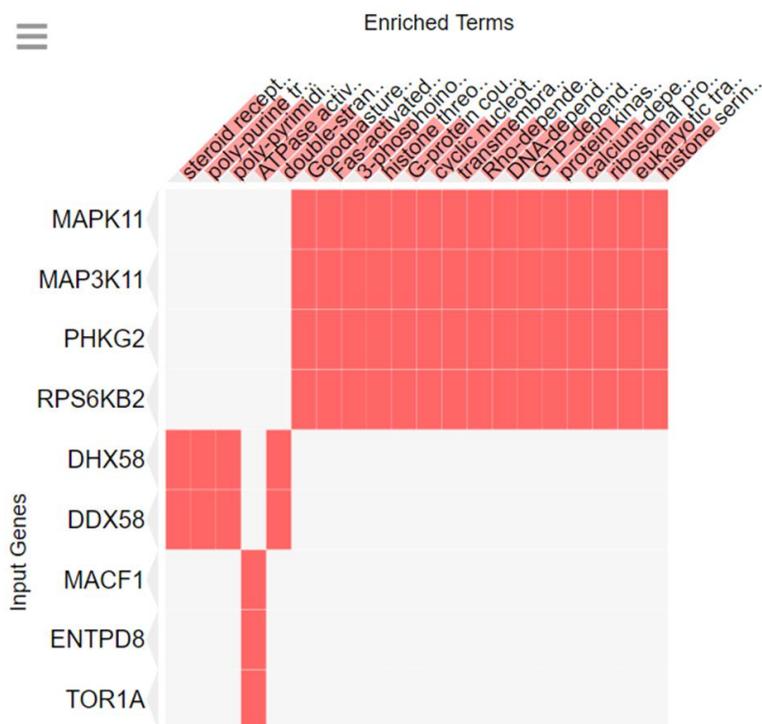


Figura 30. Ontología de los genes diferencialmente metilados según la función molecular. Se muestran los términos enriquecidos según la significancia estadística $p \leq .005$

La tabla 15 y figura 30 muestran los genes diferencialmente metilados según la función molecular evidenciando que los genes con mayores cambios son MAPK11, MAP3K11, PHKG2, RPS6KB2.

Tabla 16. Vías de señalización de genes diferencialmente metilados

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
1	RIG-I-like receptor signaling pathway_Homo sapiens_hsa04622	0.001220	0.1208	-1.73	11.63
2	Leukocyte transendothelial migration_Homo sapiens_hsa04670	0.008001	0.3961	-1.70	8.21
3	Epstein-Barr virus infection_Homo sapiens_hsa05169	0.04607	0.6938	-1.90	5.84
4	Glutathione metabolism_Homo sapiens_hsa00480	0.04689	0.6938	-1.75	5.37

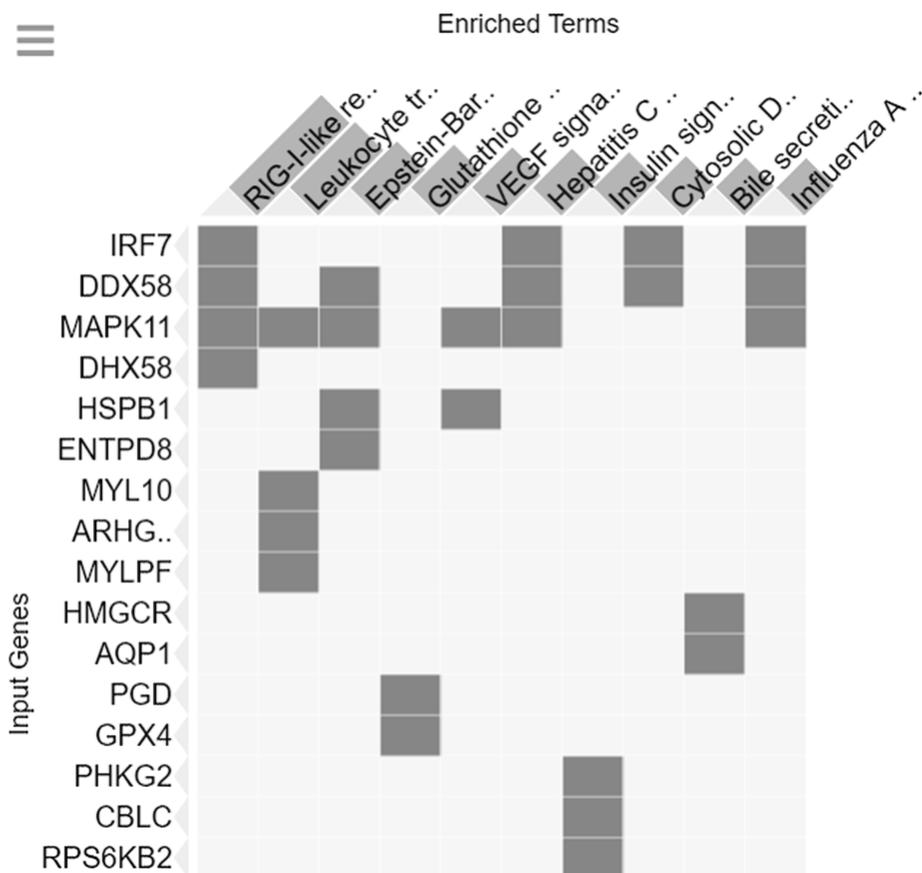


Figura 31. Vías de señalización enriquecidas de los genes diferencialmente metilados $p \leq .005$

La tabla 16 y figura 31 evidencian enriquecimiento en las vías de señalización asociadas a la infección por VPH, relacionadas con la activación del sistema inmune del huésped y otras

relacionadas con la activación y proliferación del ciclo celular. De forma interesante los genes alterados por metilación también se encuentran asociados a otro tipo de infecciones virales como Epstein Barr, Hepatitis e Influenza.

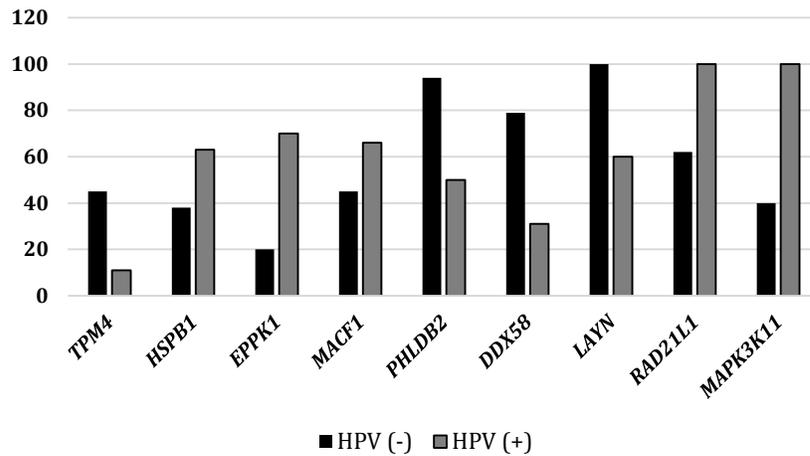


Figura 32. Porcentaje de Metilación de los genes implicados en regulación del citoesqueleto identificados en el análisis de ontología génica, de las muestras HPV (+) comparadas con las HPV (-).

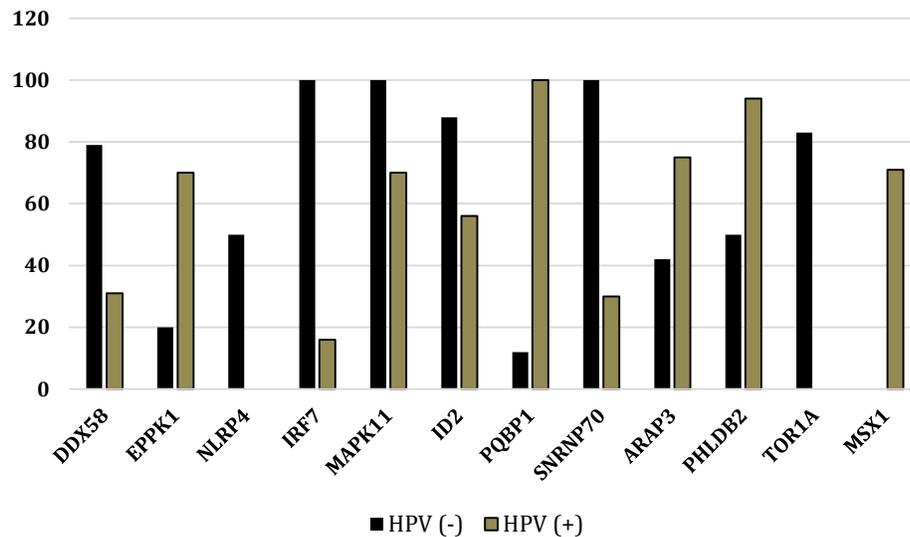


Figura 33. Porcentaje de Metilación de los genes implicados en regulación del sistema inmunológico en el análisis de ontología génica, de las muestras HPV (+) comparadas con las HPV (-).

La figura 32 evidencia que hay una diferencia en el porcentaje de metilación de genes implicados en la regulación del citoesqueleto entre los dos grupos, observándose genes tanto hipermetilados como hipometilados para las muestras VPH(-) y VPH(+).

El porcentaje de metilación de aquellos genes implicados en la regulación del sistema inmunológico se observa en la figura 33, donde gráficamente se evidencian diferencias importantes entre los grupos, teniendo en cuenta que el programa Enrichr con el cual se corrió el análisis bioinformático arrojó los resultados de los genes diferenciales que fueron estadísticamente singificativos.

9. DISCUSION

Teniendo en cuenta la información recogida en este estudio, desde los parámetros sociodemográficos, encontramos que el 63% de las muestras eran de pacientes femeninos, el promedio de edad fue de 55.2 ± 1.7 dentro de un margen de edad entre 30 y de 82 años, sin observarse diferencias significativas entre los grupos. La edad mínima en este estudio es consistente con estudios que afirman que los pacientes con este tipo de lesiones asociadas a VPH son más jóvenes que aquellos cuyo factor de riesgo es tabaco y alcohol. [Chaturvedi *et al*, 2011. Ang *et al*, 2010].

Dentro de las lesiones precancerosas establecidas por la OMS, la leucoplasia y la eritroplasia son las más comunes. En el presente estudio el 66% de las muestras evaluadas tenían como diagnóstico clínico leucoplasia, lo que coincide con los reportes de estudios anteriores que determinan que esta es una de las lesiones precancerosas más común desde el aspecto clínico [Messadi, 2013].

Las lesiones precancerosas pueden localizarse en cualquier lugar de la cavidad oral, sin embargo existe un mayor riesgo de malignización para aquellas lesiones que se localizan en la lengua y el piso de boca. En cuanto a la localización de las lesiones, el estudio reporta que la lengua es el lugar donde con mayor frecuencia se presentaron lesiones (29.27%) lo que corrobora lo publicado en estudios anteriores donde se registra la lengua y el piso de boca como los lugares más comunes [Haya-Fernández *et al*, 2004], sin embargo en el estudio la encía (24.39%), y el paladar (21.45%) ocuparon los siguientes valores de frecuencia, siendo estos los últimos en frecuencia según lo publicado por Haya-Fernández *et al*, en el 2004.

El virus del papiloma humano tiene predilección por células epiteliales de superficies cutáneas y mucosas, teniendo la capacidad de infectar y causar lesiones [Kreimer *et al*, 2005]. Estudios previos reportan que el VPH es un agente carcinogénico de vías aéreas altas incluyendo cavidad oral [Gillson *et al* 2014; Reuschenbach 2013; Gillson *et al*, 2000; Kremer, 2005]. La IARC en el año 2009 lo reconoce como un agente causal de cancer oral, a nivel mundial se ha reportado una prevalencia del VPH asociado a cancer de cavidad oral en un 20.2% [Isayeva *et al*, 2012], así como un 19.9% en lesiones pre malignas [Giovannelli *et al* en el 2002], sin embargo hay estudios que han determinado que en Latinoamérica la prevalencia esta entre 27.4 al 60%

[Premoli-De-Percoco, 2001; Ibieta et al, 2005] lo que coincide con los hallazgos del presente estudio, que identifico una frecuencia de muestras positivas para VPH del 51.22%.

Los genotipos de VPH de alto riesgo, se encuentran asociados a lesiones de cancer en cavidad oral siendo el VPH16 el que se encuentra en un mayor porcentaje [Ang et al, 2010; Smeets et al, 2008; Silva et al, 2013], en lesiones premalignas se ha reportado la presencia de VPH16 entre un 17% hasta un 80% [Agrawal et al. 2013.; Syrjänen et al., 2011] así como algunos estudios reportan el VPH16 como el de mayor prevalencia en Norte América comparados con de Europa y Asia. [Kreimer, 2005]. En nuestro estudio se pudo evidenciar por Luminex que el VPH16 se encontró en el 80% de las muestras siendo acorde con la literatura. El VHP 18 se encontró en un 35%, estos hallazgos son consistentes con estudios previos en los cuales la presencia de VPH18 se reporta en un 34% [Babiker et al, 2013; Ang et al, 2010; Smeets et al, 2008; Ibieta, 2005]. Sin embargo otros genotipos de alto riesgo fueron identificados en altos porcentajes como el VPH 31 y el VPH 45 en frecuencias del 50% y el 40% respectivamente, así como los genotipos 35, 39, 51, 59 y 68 aunque en menor proporción, datos equiparables a publicaciones anteriores en neoplasias cervicales [Khandker, 2016].

En los últimos años se ha investigado el uso de técnicas diagnósticas aplicables al laboratorio y es así como la inmuno histoquímica de proteínas relacionadas indirectamente al virus de alto riesgo (proteína p16INK4a) ha demostrado tener ventajas por su alta sensibilidad y buena especificidad [Thomas & Primeaux, 2012; Dreyer et al., 2013; Agrawal et al., 2013; Moutasim et al., 2015], la pérdida de p16INK4a por delección homocigota del gen, mutación, o hiper metilación se ha demostrado en variedad de tumores incluyendo el 54-82 % de los cánceres de cabeza y cuello, sin embargo los cánceres relacionados con el VPH-AR se caracterizan por sobre expresión de p16 como consecuencia de la transcripción de E7. Es así como algunos autores reportan sobreexpresión de la proteína p16 en un porcentaje hasta del 90% en los carcinomas de cabeza y cuello asociados a VPH AR. [Woo et al., 2013; Agrawal et al., 2013]. En el caso de lesiones precancerosas un estudio realizado sobre displasias epiteliales asociadas a VPH16, reporto que de 20 muestras con diagnóstico de displasia epitelial el 50% presento positividad focal por inmuohistoquímica para p16INK4a [Agrawal et al., 2013], resultado comparable con lo observado en este estudio, 40 muestras evaluadas en total, 21(51.22%) mostraron sobreexpresión de p16INK4a de tipo focal. La sobreexpresión de la proteína p16 se ha descrito como un marcador potencial para reconocer la presencia de displasia de la cavidad oral [Goloban *et al.*, 2005]

La sobreexpresión de p16INK4a de tipo focal se tuvo en cuenta cuando el resultado fue positivo, pero focalizado en pequeños racimos de células teñidas positivamente en un porcentaje < 25 % como lo reporta algunos estudios. [Kreimer *et al.* 2005, Bird, 2002]. Teniendo en cuenta que la población estudiada en el 84.47% tenía como diagnóstico displasia leve o moderada, se puede asumir como lo plantea Ault en el 2006, que la carga viral es baja lo que disminuye la probabilidad de progresión de la enfermedad [Ault, 2006], y este factor también puede reflejarse en la pobre marcación por IHC de la proteína p16INK4a en este estudio. Song *et al* en el 2015 manifiestan que p16INK4 es un inhibidor inducido por la integración del DNA viral y el huésped, tiene correlación positiva con el grado de displasia en lesiones de cervix y se sugiere que podría ser usado para discriminar diferentes grados de displasia en biopsias cervicales, situación que también se plantea en este estudio, sin embargo, el VPH no es el único factor de riesgo que induce sobre expresión de la proteína p16INK4a en lesiones de cavidad oral [Aslan H, 20017]

El tamaño de las librerías obtenidas se encuentra entre 189 y 234, cerca al rango obtenido por Francine *et al* en el 2015 que oscilaban entre 150-250 pb. De igual forma la mayoría de los estudios utilizan la conversión de bisulfito validado y secuenciación para medir el estado de metilación del ADN método que también fue utilizado en este estudio, buscando convertir las citosinas no metiladas en uracilos (y timinas tras la reacción de PCR), sin modificar las citosinas metiladas, obteniendo así los resultados de metilación en las islas CpG. [Feinberg & Tycko 2004].

Las infecciones persistentes con el virus del papiloma humano de alto riesgo en la mucosa oral constituyen un factor de riesgo muy fuerte para inducir carcinogénesis y progresión a lesiones malignas. El VPH infecta los queratinocitos del epitelio y tiene la habilidad de regular una red de componentes celulares que favorecen la amplificación de su genoma e inducen cambios moleculares en las células infectadas. A este respecto, se ha reportado que la infección induce la metilación del ADN de genes celulares en varios tipos de cáncer [Arvin *et al.*, 2001], presentando patrones de metilación diferenciales entre tejidos tumorales VPH-negativos y VPH-positivos; sugiriendo que los cambios epigenéticos heterogéneos juegan un papel importante en las diferencias clínicas y biológicas entre estos tumores [Rattner, 2014].

En este estudio se caracterizaron las diferencias en el nivel de metilación del ADN en lesiones precancerosas orales VPH (+) y VPH (-) por secuenciación por bisulfito reducida y representativa, observando que el virus modula el epigenoma de las células infectadas

induciendo cambios coordinados en la metilación de genes involucrados en las vías de señalización de ciclo celular, citoesqueleto y respuesta inmune.

En general, las displasias orales VPH (+) mostraron menores niveles de metilación de las islas CpG que las VPH (-) ($p = < 0.001$, Figuras 24A, y 25), que difiere a lo observado en varios estudios de carcinomas orales con mayor tendencia a la hipermetilación [Martinez et al., 2007; Holland et al., 2008; Sartor et al., 2011].

El aumento de la metilación en tumores VPH (+) se ha explicado por una mayor expresión de la enzima DNMT3a que cataliza la transferencia del grupo metilo a la citosina, y se encarga del establecimiento de patrones de metilación *de novo* [Lyon et al., 2014]. Mientras que en lesiones precancerosas la hipometilación se ha correlacionado con sitios CpG ubicados dentro de las secuencias repetitivas LINE-1 (elementos nucleotídicos intercalados largos) en varios tipos de cáncer [Das & Singal, 2004; Shigaki et al., 2013]; y algunos estudios sugieren que la hipometilación de LINE-1 puede tener algunos efectos biológicos en la promoción de la progresión tumoral [Hurt et al., 2013].

Nuestro análisis reveló que el 54% (73 de 135) de los genes metilados diferencialmente asociados con displasias orales VPH (+) estuvieron hipometilados, mientras para las muestras VPH (-) se presentó en el 39%. Las principales funciones biológicas enriquecidas con significancia estadística asociadas a los genes hipometilados fueron; regulación de la producción de interferones ($p 0.001329$; **DDX58, NLRP4, IRF7, HSPB1**) y regulación de adhesiones focales célula-célula ($p 0.009134$; **MACF1, DDX58, COL16A1, TOR1A**).

En particular, encontramos que el virus del papiloma humano metila genes asociados al control del ciclo celular, apoptosis y remodelación de citoesqueleto; dentro de estos, la quinasa activada por mitógenos (**MAP3K11 o MLK3**, PM=100%) se ha descrito induce apoptosis de varias células tumorales vía activación de la vía de estrés celular p38/JNK, y su inactivación favorece la permanencia en la fase S del ciclo celular de las células infectadas con el VPH, ya que se ha sido sugerido como un gen supresor de tumores, [Ki-Yong et al., 2004; Knackmuss et al., 2016]; el gen asociado a reparación de doble cadena (**RAD21L1**, PM=100%) componente específico del complejo de cohesina durante la meiosis en la separación de las cromátidas hermanas y los cromosomas homólogos y participa en procesos de reparación de daños de ADN de doble cadena. La inactivación de este gen por metilación contribuye a procesos carcinogénicos

[McFarlane & Wakeman, 2017]; el factor 1 de reticulación de la actina de los microtúbulos (**MACF1**, PM=60%) una proteína reguladora de la dinámica del citoesqueleto, migración celular, crecimiento y diferenciación y se ha encontrado implicado en el cambio de la morfología y fisiología de células infectadas por el virus de la influenza [Hu *et al.*, 2015; Forst, 2017].

A este respecto, algunos autores sugieren que la proteína E7 del VPH estimula eventos celulares que conducen a la reorganización del citoesqueleto de actina, lo que contribuye al cambio morfológico durante el desarrollo de lesiones precancerosas y podría aumentar la motilidad y la diseminación metastásica de las células cancerosas [Tarik *et al.*, 2014]. Lo que sugiere que el virus modula la metilación de estos genes como una estrategia para mantener las células en el ciclo celular y duplicar su genoma para producir cambios en las células epiteliales.

Por otra parte, se encontró que el VPH modula genes implicados en la regulación del sistema inmunológico del huésped.

La hipometilación del factor regulador de interferón 7 (**IRF7**, PM= 16%) un factor de transcripción involucrado en la producción de interferones en respuesta a infecciones virales es un hallazgo muy interesante en el contexto biológico del VPH, ya que otros autores lo han reportado para el virus Epstein-Barr interactuando directamente con el ADN viral y activando el promotor de la proteína 1 de la membrana latente del oncogén viral potenciando los efectos oncogénicos del virus [Ning *et al.*, 2015].

Los factores reguladores del interferón IRF-7 desempeñan papeles clave en la activación de la respuesta inmune innata a las infecciones virales. Oldak *y col*; 2011, demostraron por primera vez que IRF-7 que se expresa en las capas suprabasales de la epidermis humana y regula la transcripción del VPH, aumentado la actividad del promotor tardío del virus a través de la unión directa al ADN viral [Oldak *et al.*, 2011], proceso que podría estar implicado en el desarrollo de lesiones premalignas de cavidad oral.

El gen viral E2, del VPH 16 y 18, interactúa con múltiples proteínas en todo el proceso de infección y transcripción del virus, Muller *et al* en el 2012 reportaron que unas de esas proteínas fueron HSP, MAP y DDX como lo demuestra nuestro estudio.

La proteína E7 de HPV16 se une a IRF1 (interferon-regulatory factor) y bloquea la transcripción de IFN- β , en cambio la proteína E5 de HPV16 mejora la expresión de IFN- β e IRF1 [Tummers

et al., 2015], lo que puede explicar la regulación positiva y negativa del INF encontrados en este estudio. El IFN tipo I es un importante factor antiviral y su respuesta de defensa contra los virus se produce principalmente mediante la transducción de señales y la activación de la transcripción de vías, lo que da como resultado una serie de genes regulados por interferón que generan muchas enzimas y proteínas que actúan sobre los virus buscando proteger al huésped de la infección [Zhang et al., 2005], por otro lado se ha reportado que algunos virus tienen la capacidad de escapar al INF cuando se unen al receptor de INF bloqueando algunas vías de señalización

Los resultados de este estudio permiten sugerir que el VPH puede alterar la inmunovigilancia y la homeostasis celular desregulando la expresión génica en las células huésped, al menos en parte a través de mecanismos epigenéticos. Inicialmente, el VPH estimula la remodelación del citoesqueleto y la proliferación de las células infectadas como un mecanismo para favorecer la replicación y la persistencia viral. Estos eventos están mediados por las oncoproteínas E6 y E7.

Es importante considerar que este estudio tuvo limitaciones relacionadas con la utilización de muestras embebidas en parafina, sujetas a procesos de conservación, manipulación y procesamiento histológico imposibles de controlar, lo que compromete la calidad de los ácidos nucleicos que se obtienen para los estudios de secuenciación genómica. Por otro lado, las biopsias de lesiones en cavidad oral en su mayoría no superan los 5 mm de diámetro. Esto limita considerablemente la obtención de ADN con una concentración y calidad adecuada para ser utilizados en procesos de secuenciación RRBS, como lo reporta Pikor en el 2011.

Las diferencias de metilación entre los grupos VPH(+) p16(+) y VPH(-) p16(+), fueron independientes de la localización de la lesión, como lo sugerido por Lleras en el 2013. En cuanto al grado de displasia este estudio no mostró diferencias en el grupo VPH(+) p16(+) cuyas muestras estaban representadas en displasia leve, moderada y severa, sugiriendo que los cambios en la metilación de lesiones precancerosas ocurren como eventos muy tempranos durante el desarrollo de la carcinogénesis en cavidad oral y presenta patrones similares independiente del resultado histopatológico en las muestras. Este resultado sugiere que la identificación de cambios en la metilación podría incrementar el riesgo de desarrollar cáncer oral como lo plantea Díez-Perez en el 2011.

CONCLUSIONES

La positividad de p16 en lesiones displásicas asociadas a VPH no evidencian los parámetros en su totalidad para poder determinarlos como p16 positivos, sin embargo, hay una manifestación de la activación de la proteína en estadios muy tempranos de la lesión.

El VPH modula diferencialmente el grado de metilación del DNA y es un importante factor epigenético en el proceso de carcinogénesis de lesiones precancerosas en cavidad oral.

Identificar las diferencias en los perfiles de metilación de lesiones precancerosas orales asociadas a VPH puede proporcionar aplicaciones clínicas prometedoras y para el tratamiento personalizado del cáncer.

El gran número de genes hipometilados en lesiones precancerosas de cavidad oral asociadas a VPH, podría afectar la expresión génica disminuyendo la capacidad de respuesta del huésped en la respuesta inmunológica y favoreciendo la progresión de la lesión a cáncer.

Es importante continuar con la línea de investigación para dar respuesta a otros interrogantes que surgen por los resultados obtenidos en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Agrawal GP, Joshi PG, Agrawal A. Role of HPV-16 in Pathogenesis of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma and Correlation of p16INK4A Expression in HPV-16 Positive Cases: An Immunohistochemical Study, *ISRN Pathology*. 2013; Article ID 807095, 7 pages, doi:10.1155/2013/807095
- Anayannis NV, Schlecht NF, Belbin TJ. Epigenetic Mechanisms of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2015 Nov;139(11):1373-8. doi: 10.5858/arpa.2014-0554-RA. Epub 2015 May 15. Review. PubMed PMID: 25978766.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24-35.
- ArvindK. Virmani, Carolyn Muller, Asha Rathi, Sabine ZoechbauerMueller, Michael Mathis and Adi F. Gazdar. Aberrant Methylation during Cervical Carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2001; (7) (3) 584-589;
- Aslan H, Ozcul Y, Pinar E, Isik E, Aladag I, Imre A, Songu M, Etir D. Effect of p16 positivity in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *ENT Updates* 2017;7(1):17–21
- Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006 Suppl:40470. Review. PubMed PMID: 16967912; PubMed Central PMCID: PMC1581465.
- Babiker AY, Eltom FM, Abdalaziz MS, Rahmani A, Abusail S, Ahmed HG. Screening for high risk human papilloma virus (HR-HPV) subtypes, among Sudanese patients with oral lesions. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2013;6(4):275-281.
- Balderas A, Anaya G, Ramirez, Amador VA, Guido MC, Kalantari M, Calleja IE, Bernard HU, Garcia A. Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2007, 120: 2165-2169. *Int J Cancer* 2007;120:2165-2169.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al. World health organization. Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005: 283–328.

- Belleudi F, Leone L, Purpura V, Cannella F, Scrofani C, Torrisi R. HPV16 E5 Affects the KGFR/FGFR2b-Mediated Epithelial Growth Through Alteration of the Receptor Expression, Signalling and Endocytic Traffic. *Oncogene*. 2011; 30:4963-4976.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6-21. Review. PubMed PMID: 11782440.
- Bird, A., M. Taggart, M. Frommer, O. J. Miller and D. Macleod (1985). "A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA." *Cell* 40(1): 91-99.
- Bishop, J. A. Histopathology of human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma: a review of classic and variant forms. *Diagn. Histopathol.*, 21(2):70-6, 2015.
- Breitbart, F., O. Croissant, and G. Orth. 1987. Expression of human papillomavirus type 1 E4 gene products in warts. *Cancer. Cells* 5:115-122.
- Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):2839-46. PubMed PMID: 15709003; PubMed Central PMCID: PMC548454.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):1-17. Review. PubMed PMID: 12525422; PubMed Central PMCID: PMC145302.
- Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr;29(2):291-319. doi: 10.1128/CMR.00013-15. Review. PubMed PMID: 26912568; PubMed Central PMCID: PMC4786885.
- Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet*. 2002 Jun;18(6):275-7. PubMed PMID: 12044346.
- Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6476-86. PubMed PMID: 8411351; PubMed Central PMCID: PMC238084.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29: 4294–4301.
- Chen T LE. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;301(1794201).
- Contreras, W. & Venegas, B. Virus papiloma humano en cáncer oral y orofaríngeo. Revisión de la literatura. *Int. J. Odontostomat.*, 9(3):427-435, 2015.

- Cooper, D. N., M. H. Taggart and A. P. Bird (1983). "Unmethylated domains in vertebrate DNA." *Nucleic Acids Res* 11(3): 647-658.
- Cortese S, Ashrafi H, Campo S. All Four Di-Leucine Motifs in the First Hydrophobic Domain of the E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 are Essential for Surface MHC Class I Downregulation Activity and E5 Endomembrane Localization. *Int J Canc.* 2010; 126: 1675-1682.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001 May;38(5):285-303. Review. PubMed PMID: 11333864; PubMed Central PMCID: PMC1734882.
- Cubie HA, Cuschieri K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. *Cytopathology.* 2013 Oct;24(5):289-308. doi: 10.1111/cyt.12083. Epub 2013 Sep 2. Review. PubMed PMID: 23998275.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups.. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Oct;136(10):1266-97.
- Dean PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15;22(22):4632-42.
- De la Cruz Hernandez E, Betancourt A. M, Soberon M. L. Cellular and viral elements involved in the replication of human papilloma virus. *Rev Oncol* 2004;6(5):263-71
- Degli Esposti D, Sklias A, Lima SC, Beghelli-de la Forest Divonne S, Cahais V, Fernandez-Jimenez N, Cros MP, Ecsedi S, Cuenin C, Bouaoun L, et al. Unique DNA methylation signature in HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas. *Genome Med.* 2017 Apr 5;9(1):33. doi: 10.1186/s13073-017-0419-z. PubMed PMID: 28381277; PubMed Central PMCID: PMC5382363.
- Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of Virology.* 1997;71(12):9343-9349
- Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *The EMBO Journal.* 1997;16(3):504-514. doi:10.1093/emboj/16.3.504.

- Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, Thierry F. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*. 1999 Aug 12;18(32):4538-45. PubMed PMID: 10467398.
- Díez-Pérez R, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain J, Bascones-Martinez A. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol Rep*. 2011 May;25(5):1203-9. doi: 10.3892/or.2011.1205. Epub 2011 Mar 4. Review. PubMed PMID: 21380489.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 2015;25(Suppl Suppl 1):2-23. doi:10.1002/rmv.1822.
- Doorbar J, Evans HS, Coneron I, Crawford LV, Gallimore PH. Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *The EMBO Journal*. 1988;7(3):825-833.
- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008. Epub 2013 Sep 7. PubMed PMID: 24016539.
- Dreyer JH, Hauck F, Oliveira-Silva M, Barros MHM, Niedobitek G. Detection of HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma: a practical proposal. *Virchows Arch*. 2013; 462: 381-389.
- El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck*. 2012 Apr;34(4):459-61. doi: 10.1002/hed.21974. Epub 2011 Dec 16. PubMed PMID: 22180304.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2449-56. PubMed PMID: 9032382; PubMed Central PMCID: PMC191355.
- Evans MF, Matthews A, Kandil D, Adamson CS-C, Trotman WE, Cooper K. Discrimination of “Driver” and “Passenger” HPV in Tonsillar Carcinomas by the Polymerase Chain Reaction, Chromogenic In Situ Hybridization, and p16INK4a Immunohistochemistry. *Head and Neck Pathology*. 2011;5(4):344-348. doi:10.1007/s12105-011-0282-y.
- Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7213-8. PubMed PMID: 12499261.

- Farkas SA, Milutin-Gašperov N, Grce M, Nilsson TK. Genome-wide DNA methylation assay reveals novel candidate biomarker genes in cervical cancer. *Epigenetics*. 2013 Nov;8(11):1213-25. doi: 10.4161/epi.26346. Epub 2013 Sep 12. PubMed PMID: 24030264.
- Feinberg, A. P. & Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature Rev. Cancer*. 4: 1-11.
- Fouts, E. T., X. Yu, E. H. Egelman, and M. R. Botchan. 1999. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J. Biol. Chem.* 274:4447-4458.
- Fragoso-Ontiveros Veronica, Alvarez-Garcia Rosa Maria, Contreras-Paredes Adriana, Vaca-Paniagua Felipe, Herrera Luis Alonso, Lopez-Camarillo Cesar, Jacobo-Herrera Nadia, Lizano-Soberón Marcela, Perez-Plasencia Carlos. Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogénesis. *Virology*, 2012-10-10, Volúmen 432, Número 1, Páginas 81-90
- Forst CV, Zhou B, Wang M, et al. Integrative gene network analysis identifies key signatures, intrinsic networks and host factors for influenza virus A infections. *NPJ Systems Biology and Applications*. 2017;3:35
- French D, Lorenzon L. HPV Infections: Basis of Neoplastic Transformation and Related Molecular Tests. *Curr Pharm Des* 2013;19(8):1371-1378.
- García DA, Cid-Arregui A, Schmitt M, Castillo M, Briceño I, Aristizábal FA. Highly Sensitive Detection and Genotyping of HPV by PCR Multiplex and Luminex Technology in a Cohort of Colombian Women with Abnormal Cytology. *The Open Virology Journal*. 2011;5:70-79. doi:10.2174/1874357901105010070.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* 196(2): 261-282.
- Gillison ML et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. 2000.
- Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, et al. Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer*. 2014;134:497-507.
- Gillitzer E, Chen G, Stenlund A. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *The EMBO Journal*. 2000;19(12):3069-3079. doi:10.1093/emboj/19.12.3069.

- Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, Ammatuna P. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis.* 2002 Mar 15;185(6):833-6. Epub 2002 Feb 20. PubMed PMID: 11920302.
- Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001 Feb;75(3):1565-70. PubMed PMID: 11152531; PubMed Central PMCID: PMC114064.
- Gologan O, Barnes EL, Hunt JL: Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J surg Patol* 2005, 29: 792 – 796
- Goon P, Stanley M, Ebmeyer J, Steintraesser L, Upile T, Jerjes W, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head & Neck Oncology* 2009 January 1;1(1):36.
- Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infectious Disease Clinics of North America.* 2005;19:439-458.
- Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011 Dec;121(12):4593-9. doi: 10.1172/JCI57149. Epub 2011 Dec 1. Review. PubMed PMID: 22133884; PubMed Central PMCID: PMC3225991.
- Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, Konge L, von Buchwald C. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer.* 2014 Mar 18;110(6):1587-94. doi: 10.1038/bjc.2014.42. Epub 2014 Feb 11. Review. PubMed PMID: 24518594; PubMed Central PMCID: PMC3960616.
- Guerrero-Preston R, Baez A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M. Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *P R Health Sci J* 2009;28:24-29.
- Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck.* 2011 Nov;33(11):1622-7. doi: 10.1002/hed.21650. Epub 2010 Dec 28. PubMed PMID: 21990227.
- Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 Expression and Function Is Abolished by the Cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16. *The Journal of Immunology* March 1, 2007, 178 (5) 3186-3197
- Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncoimmunology.* 2014;3:e27257. doi:10.4161/onci.27257.

- Haya-Fernández M, Bagán J, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*. 2004;10:346-348.
- Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:343.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1218-23. Epub 2001 Jan 23. PubMed PMID: 11158620; PubMed Central PMCID: PMC14735.
- Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Durst M, Hoppe-Seyler F. Activation of the Enhancer of Zeste Homologue 2 Gene by the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Cancer Res* 2008; 68: (23).
- Hu L, Su P, Li R, et al. Knockdown of microtubule actin crosslinking factor 1 inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *BMB Reports*. 2015;48(10):583-588.
- Hur K, Cejas P, Feliu J, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2014;63(4):635-646.
- Husain N, Neyaz A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2017;7(3):198-205. doi:10.1016/j.jobcr.2017.08.003.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2007. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 90.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>
- Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, Mohar A. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Mar;99(3):311-5. PubMed PMID: 15716837.
- Iftner T VL. Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Mono* 2003;31:80-8.
- Iftner T, Wang L, Iftner A, et al. Study-based evaluation of the Abbott RealTime High Risk HPV test in comparison to the HC2 HR HPV test in women aged ≥30 years using residual LBC ThinPrep specimens. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16:672. doi:10.1186/s12879-016-1994-0.

- Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non- oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol.* 2012 Jul;6 Suppl 1:S104-20. doi: 10.1007/s12105-012-0368-1. Epub 2012 Jul 3. Review. PubMed PMID: 22782230; PubMed Central PMCID: PMC3394168.
- Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund O, Johansson B, von Knebel Doeberitz M, Meijer CJ, Meyer T, Nindl I, Pfister H, Stockfleth E, Strand A, Wadell G, Walboomers JM. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *J Clin Pathol.* 1999 Jul;52(7):498-503. Erratum in: *J Clin Pathol* 1999 Oct;52(10):790. PubMed PMID: 10605401; PubMed Central PMCID: PMC501489.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:245-54. Review. PubMed PMID: 12610534.
- Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin.* 2001 Mar-Apr;51(2):92-114; quiz 115-8. Review. PubMed PMID: 11577486.
- Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, Gill S, Frustino J, Wilding G, Loree T, Popat S, Sullivan M. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011 Nov;47(11):1048-54. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.07.009. Epub 2011 Aug 3. Review. PubMed PMID: 21816661; PubMed Central PMCID: PMC3640331.
- Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, Dhanda J, Lane B, Liloglou T, Shaw RJ. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013 Feb 5;108(2):370-9. doi: 10.1038/bjc.2012.568. Epub 2013 Jan 3. PubMed PMID: 23287992; PubMed Central PMCID: PMC3566828.
- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and etiology. *Periodontol 2000.* 2011;57:19–37.
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1068-70. PubMed PMID: 11498573.
- Jones, P. A., and S. B. Baylin. "The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer." *Nat Rev Genet* 3, no. 6 (2002): 415-28.
- Kambic V, Gale N. Significance of keratosis and dyskeratosis for classifying hyperplastic aberrations of laryngeal mucosa. *Am J Otolaryngol.* 1986 Sep-Oct;7(5):323-33. PubMed PMID: 2430482.

- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Feb;7(1):79-89. Review. PubMed PMID: 17305480.
- Khandker E. Detection of human papillomavirus by hybrid capture and real time PCR methods in patients with chronic cervicitis and cervical intraepithelial neoplasia. *IMC J Med Sci* 2016; 10(2): 45-48 .
- Ki-Yong Kim, Byung-Chul Kim, Zhiheng Xu, Seong-Jin Kim. Mixed lineage kinase 3 (mlk3)-activated p38 map kinase mediates transforming growth factor- β -induced apoptosis in hepatoma cells. *The journal of biological chemistry* 2004. vol. 279, no. 28, pp. 29478–29484, 2004
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001 Apr 15;92(2):276-84. PubMed PMID: 11291057.
- Knackmuss U, Lindner SE, Aneichyk T, et al. MAP3K11 is a tumor suppressor targeted by the oncomiR miR-125b in early B cells. *Cell Death and Differentiation*. 2016;23(2):242-252.
- Kostopoulou E, Samara M, Kollia P, Zacharouli K, Mademtzis I, Daponte A, Messinis IE, Koukoulis G. Different patterns of p16 immunoreactivity in cervical biopsies: correlation to lesion grade and HPV detection, with a review of the literature. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(1):54-61. Review. PubMed PMID: 21446326.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005;14(2):467-475.
- Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):987-93. Epub 2006 May 30. PubMed PMID: 16731030.
- Lauvau G, Goriely S. Memory CD8⁺ T Cells: Orchestrators and Key Players of Innate Immunity? Round JL, ed. *PLoS Pathogens*. 2016;12(9):e1005722. doi:10.1371/journal.ppat.1005722.
- Lechner M, Fenton T, West J, Wilson G, Feber A, Henderson S, Thirlwell C, Dibra HK, Jay A, Butcher L, Chakravarthy AR, Gratrix F, Patel N, Vaz F, O'Flynn P, Kalavrezos N, Teschendorff AE, Boshoff C, Beck S. Identification and functional validation of HPV-

mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Genome Med.* 2013 Feb 5;5(2):15. doi: 10.1186/gm419. eCollection 2013. PubMed PMID: 23419152; PubMed Central PMCID: PMC3706778.

- Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):497-504. PubMed PMID: 11418688.
- Liu, J.-S., S.-R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate HPV-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free replication. *J. Biol. Chem.* 1998. 273:30704-30712.
- Lleras R, Smith R, Adrien L, Schlecht N, Burk R, Harris T, Childs G, Prystowsky M, Belbin T. Unique DNA Methylation Loci Distinguish Anatomic Site and HPV Status in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2013.
- Lomnytska MI, Becker S, Bodin I, Olsson A, Hellman K, Hellström AC, Mints M, Hellman U, Auer G, Andersson S. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. *Br J Cancer.* 2011 Jan 4;104(1):110-9.
- Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):362-72. Review. PubMed PMID: 15187189; PubMed Central PMCID: PMC419925.
- López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer cervicouterino y el virus de Papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología.* 2006;1:31–55.
- Lyon D, Elmore L, Aboalela N, et al. Potential Epigenetic Mechanism(s) Associated With the Persistence of Psychoneurological Symptoms in Women Receiving Chemotherapy for Breast Cancer: A Hypothesis. *Biological research for nursing.* 2014;16(2):160-174.
- Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001 Nov 26;20(54):7874-87. Review. PubMed PMID: 11753670.
- Martín-Hernán F, Sánchez-Hernández JG, Cano J, Campo J, del Romero J. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal.* 2013;18(3):e439-e444. doi:10.4317/medoral.18419.

- Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2007;43(2):415-432
- McFarlane RJ, Wakeman JA. Meiosis-like Functions in Oncogenesis: A New View of Cancer. *Cancer Res*. 2017 Nov 1;77(21):5712-5716
- McBride HJ, et al. Long-range interactions at the HO promoter. *Mol Cell Biol* 1997. 17(5):2669-78
- McMurray H, Nguyen D, Westbrook T, Mcance D. Biology of human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology*. 2001;82(1):15-33. doi:10.1046/j.1365-2613.2001.00177.x.
- Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):516-20. doi: 10.1002/ijc.24010. PubMed PMID: 18973271; PubMed Central PMCID: PMC2789446.
- Mensaert K, Van Criekinge W, Thas O, et al. Mining for viral fragments in methylation enriched sequencing data. *Frontiers in Genetics*. 2015;6:16. doi:10.3389/fgene.2015.00016.
- Messadi DV. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *International Journal of Oral Science*. 2013;5(2):59-65. doi:10.1038/ijos.2013.24.
- Mirghani H, Amen F, Blanchard P, Moreau F, Guigay J, Hartl DM, Lacau St Guily J. Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer*. 2015 Apr 1;136(7):1494-503. doi: 10.1002/ijc.28847. Epub 2014 Apr 4. Review. PubMed PMID: 24622970.
- Mirghani H, Amen F, Moreau F, Guigay J, Ferchiou M, Melkane AE, Hartl DM, Lacau St Guily J. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol*. 2014 Jan;50(1):1-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.10.008. Epub 2013 Oct 26. Review. PubMed PMID: 24169585.
- Moison C, Guieysse-Peugeot AL, Arimondo PB. DNA methylation in cancer. *Atlas Genetic Cytogenetic Oncol Haematol*. 2014; 18(4):285-292
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S43-51. Review. PubMed PMID: 15753011.

- Moutasim KA., Robinson M, Thavaraj S. Human papillomavirus testing in diagnostic head and neck histopathology. *Diagnostic Histopathology*, 2015-02-01, Volúmen 21, Número 2, Páginas 77-84
- Muller M, Jacob Y, Jones L, Weiss A, Brino L, et al. Large Scale Genotype Comparison of Human Papillomavirus E2-Host Interaction Networks Provides New Insights for E2 Molecular Functions. *PLoS Pathog.* 2012; 8(6): e1002761
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology.* 2004;78(21):11451-11460. doi:10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004.
- Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene.* 2001 Oct 31;278(1-2):25-31. Review. PubMed PMID: 11707319.
- Nam EJ, Kim JW, Hong JW, et al. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *Journal of Gynecologic Oncology.* 2008;19(3):162-168. doi:10.3802/jgo.2008.19.3.162.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1505-11. Epub 2007 Jul 23. Review. PubMed PMID: 17645777.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001 May;75(9):4283-96. PubMed PMID: 11287578; PubMed Central PMCID: PMC114174.
- Nichols A, Palma D, Dhaliwal S, Tan S, Theuer J, Chow W, et al. The epidemic of human papillomavirus and oropharyngeal cancer in a Canadian population. *Current Oncology* 2013;20(4):212.
- Ning S, Huye LE, Pagano JS. Interferon Regulatory Factor 5 Represses Expression of the Epstein-Barr Virus Oncoprotein LMP1: Braking of the IRF7/LMP1 Regulatory Circuit. *Journal of Virology.* 2005;79(18):11671-11676. doi:10.1128/JVI.79.18.11671-11676.2005.
- Nonkwelo C, Ruf IK, Sample J. Interferon-independent and -induced regulation of Epstein-Barr virus EBNA-1 gene transcription in Burkitt lymphoma. *Journal of Virology.* 1997;71(9):6887-6897.

- Nuovo GJ, Moritz J, Walsh LL, MacConnell, P, Koulos J. Predictive value of human papillomavirus DNA detection by filter hybridization and Polymerase Chain Reaction in women with negative results of colposcopic examination. *Anatom Pathol*. 1992;98(5):489-92.
- Oh ST, Longworth MS, Laimins LA. Roles of the E6 and E7 Proteins in the Life Cycle of Low-Risk Human Papillomavirus Type 11. *Journal of Virology*. 2004;78(5):2620-2626. doi:10.1128/JVI.78.5.2620-2626.2004.
- Oldak M, Tolzmann L, Wnorowski A, et al. Differential Regulation of Human Papillomavirus Type 8 by Interferon Regulatory Factors 3 and 7. *Journal of Virology*. 2011;85(1):178-188.
- Paaso A, Koskimaa HM, Welters MJ, Grénman S, Syrjänen K, van der Burg SH, Syrjänen S. Cell mediated immunity against HPV16 E2, E6 and E7 peptides in women with incident CIN and in constantly HPV-negative women followed-up for 10-years. *J Transl Med*. 2015 May 20;13:163. doi: 10.1186/s12967-015-0498-9. PubMed PMID: 25990808; PubMed Central PMCID: PMC4448180.
- Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ, Namkoong SE. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol*. 1997 Apr;65(1):121-9. PubMed PMID: 9103401.
- Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005 Nov 17;438(7066):364-8. PubMed PMID: 16292312.
- Pathak A, Singh M, Agarwal A, Amit S. Determination of p16 overexpression as an indicator of human papillomavirus infection in oral dysplasia and carcinoma. *Indian J Dent Res*. 2017 Jul-Aug;28(4):418-423. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_79_15. PubMed PMID: 28836534.
- Perrone F, Gloghini A, Cortelazzi B, Bossi P, Licitra L, Pilotti S. Isolating p16-positive/HPV-negative oropharyngeal cancer: an effort worth making. *Am J Surg Pathol*. 2011 May;35(5):774-7; author reply 777-8. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182116a45. PubMed PMID: 21436677.
- Pfister DG, Ang KK, Brizel DM, Burtness BA, Cmelak AJ, Colevas AD, Dunphy F, Eisele DW, Gilbert J, Gillison ML, Haddad RI, Haughey BH, Hicks WL Jr, Hitchcock YJ, Kies MS, Lydiatt WM, Maghami E, Martins R, McCaffrey T, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Samant S, Sanguineti G, Schuller DE, Shah JP, Spencer S, Trotti A 3rd, Weber RS, Wolf GT, Worden F; National Comprehensive Cancer Network.. Head and neck cancers.

- J Natl Compr Canc Netw. 2011 Jun 1;9(6):596-650. Review. Erratum in: J Natl Compr Canc Netw. 2011 Jul;9(7)
- Pikor LA, Enfield KSS, Cameron H, Lam WL. DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE. 2011;(49):2763.
 - Premoli-De-Percoco G RJ. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. *J Oral Pathol Med* 2001 Jul 30;6:355-61.
 - Quintero K, Giraldo G, Uribe M, Baena A, Lopez C, Alvarez E, Sanchez G. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79(3):37
 - Raj, D., Brash, D.E., Grossman, D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006; 126(2):243-257
 - Rattner BP. In this issue of *Epigenetics*, *Epigenetics*, 2014; 9:2, 183-185
 - Rautava, J. Syrjänen, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *JADA* 2011;142(8):905-914.
 - Reuschenbach M DM. Diagnostic test of the detection of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Bentham Science publishers* 2013;19:1358-1370.
 - Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Minucci D, Naldoni C, Rizzolo R, Schincaglia P, Volante R, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J, Segnan N; New Technologies for Cervical Cancer Screening Working Group. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Apr 2;100(7):492-501. doi: 10.1093/jnci/djn065. Epub 2008 Mar 25. PubMed PMID: 18364502.
 - Sanabria JG. Virus del Papiloma humano. *Rev Ciencias Médicas [Internet]*. 2009 Dic; 13 (4): 168-187.
 - Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, Colacino JA, Prince ME, Carey TE, Rozek LS. Genome-wide methylation and expression differences in HPV (+) and HPV (-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics* 2011; 6:777-87
 - Serena-Gómez Eduardo, Bologna-Molina Ronell Eduardo, Nevarez-Rascon Alfredo, Rocha Buelvas Anderson. Prevalencia del VPH en el Proceso de Malignización de

Lesiones de Vías Aérodigestivas Superiores. Int. J. Odontostomat. [Internet].

2011 Abr; 5(1): 5-12.

- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
- Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, et al. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer*. 2013;16(4):480-487
- Silva R, León D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Detection of human papilloma virus infection in men. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 2013; 30:186.
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465-72. PubMed PMID: 17680565.
- Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. . *J Adolesc Health* 2008;43:5-25.
- Song D, Li H, Dai J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncology Letters*. 2015;10(2):600-606. doi:10.3892/ol.2015.3295.
- Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M; American Society for Colposcopy and Cervical Pathology.. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *Am J Clin Pathol*. 2007 Mar;127(3):335-7. PubMed PMID: 17276947.
- Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*. 2011 Apr;17 Suppl 1:58-72. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x. Review. PubMed PMID: 21382139.
- Tábora N, Ferrera A, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 May;78(5):843-6. PubMed PMID: 18458323.
- Gheit, Tarik; Abedi-Ardekani, Behnoush; Carreira, Christine; Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Medical Virology*. 2014, Vol 86:4

- Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol.* 2012 Apr;16(2):91-9. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2011.09.002. Epub 2011 Dec 23. PubMed PMID: 22197546.
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevidis E. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009 May;35(3):210-20. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.10.005. Epub 2009 Mar 3. Review. PubMed PMID: 19261387; PubMed Central PMCID: PMC2784486.
- Tummers, B., Van Der Burg, S.H. High-risk human papillomavirus target crossroads in immune signalling. *Viruses.* 2015, 7:2485-2506. doi:10.3390/v7052485.
- Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology* 45 (2009) 317–323
- Van Houten VM, Snijders PJ, Van den Brekel MW, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002;93:232-5.
- Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 2001 Dec;23(12):1131-7. Review. PubMed PMID: 11746232.
- Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – An appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009;207:471–5.
- Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR. Variable Oncogene Promoter Activity of Human Papillomavirus Type 16 Cervical Cancer Isolates from Australia. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001;39(5):2009-2014. doi:10.1128/JCM.39.5.2009-2014.2001.
- Weinberger PM, Yu Z, Kountourakis P, Sasaki C, Haffty BG, Kowalski D, Merkley MA, Rimm DL, Camp RL, Psyrri A. Defining molecular phenotypes of human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: validation of three-class hypothesis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Sep;141(3):382-9. doi: 10.1016/j.otohns.2009.04.014. PubMed PMID: 19716018.
- Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Sep 15;107(12):djv257. doi: 10.1093/jnci/djv257. Print 2015 Dec. PubMed PMID: 26376685; PubMed Central PMCID: PMC4675094.

- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002, 21: 1510-1517. *Oncogene* 2002;21:1510-1517
- Woo SB, Cashman EC, Lerman MA. Human papillomavirus-associated oral intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol*. 2013 Oct;26(10):1288-97. doi: 10.1038/modpathol.2013.70. Epub 2013 Apr 19. PubMed PMID: 23599160.
- Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 May 11;283(3):668-73. PubMed PMID: 11341777.
- Zhang L, Cheung KJ, Jr., Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R, et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer*. 2001 Jun 1;91(11):2148-55.
- Zhang B, Chen W, Roman A. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 10;103(2):437-42. Epub 2005 Dec 28. PubMed PMID: 16381817; PubMed Central PMCID: PMC1326189.
- Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003 May 25;310(1):100-8. PubMed PMID: 12788634.
- Zhang J, Shao J, Wu X, et al. Type I interferon related genes are common genes on the early stage after vaccination by meta-analysis of microarray data. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015;11(3):739-745.
- Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286-302
- Zhu C, Ling Y, Dong C, Zhou X, Wang F. The relationship between oral squamous cell carcinoma and human papillomavirus: a meta-analysis of a Chinese population (1994-2011). *PLoS One*. 2012;7(5):e36294. doi: 10.1371/journal.pone.0036294. Epub 2012 May 3. PubMed PMID: 22570701; PubMed Central PMCID: PMC3343072.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50. Review. PubMed PMID: 12044010.
- <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngealcancer/about.html>
- 5-Methylcytosine (2015) *Wikipedia Free Encycl*.

