



## **Virus Papiloma Humano en cavidad oral: caracterización genética, estudio de mutaciones y co-infecciones como potenciales mecanismos sinérgicos de la oncogénesis**

**Jessica Paola Mosmann.**

Tesis (Doctora en Ciencias de la Salud)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias  
Médicas, 2020

Aprobada: 30 de abril de 2020.

---

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

---



Virus Papiloma Humano en cavidad oral: caracterización genética, estudio de mutaciones y co-infecciones como potenciales mecanismos sinérgicos de la oncogénesis por Jessica Paola Mosmann se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.



**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”**

**Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud**

**Virus Papiloma Humano en cavidad oral:  
caracterización genética, estudio de mutaciones y  
co- infecciones como potenciales mecanismos sinérgicos de la  
oncogénesis**

**Lic. Jessica Paola Mosmann**

jessica.mosmann@unc.edu.ar

**Directora: Dra. Cecilia Cuffini**

**2020**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## **Comisión de Seguimiento**

**Dra. Cecilia Cuffini**

**Dra. Silvia López de Blanc**

**Dra. Mabel Brunotto**

## **Tribunal evaluador**

**Dra. Mabel Brunotto**

**Dra. M. Belén Pisano**

**Dra. Marina Bottiglieri**

Artículo 43 del Reglamento para Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud:

*"La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta tesis"*

## Agradecimientos

*Nada de lo que soy hoy hubiera sido posible sin los pilares de mi vida, mamá y papá, los amo profundamente. Dedicada a ellos y eternamente agradecida.*

A mi hermana, a quien elegí, Ceci. Gracias por estar siempre y gracias por darme a una de las personitas más importantes que tengo hoy, Guillermina.

A mis amigas de toda la vida, Aldana, Alicia, Cyntia. Gracias por seguir compartiendo esta amistad y seguir creciendo juntas.

Amiga del alma, que compartimos jardín de infantes, colegio y facultad, Itatí. Gracias por tanto aguante siempre.

A mis amigas de la facu, por tantos momentos de “estudio” y anécdotas vividas, gracias Vale, Jime, Hom (Rocío), Cari, Betu, Nadia.

A dos personitas muy especiales que tuve la suerte de conocer y compartir muchos momentos, Ivana y Pau.

A quien me brindó su amistad desde el principio recién llegada a Córdoba, gracias por todo el cariño, consejos, risas y momentos compartidos que tanto extraño, Mari gracias por tanto.

A Celia que me ayudó desde la tesina y aún hoy lo sigue haciendo siempre que la necesito.

A los amigos que gané en todos estos años y que siempre están con las palabras justas, Vero, Lula y Pedro, gracias por aguantarme y hacer del trabajo una amistad. Gracias por los asados y risas que nunca faltaron.

A Juli Sosa, una gran persona que me regaló la vida.

A mis “amigos del doctorado”, porque además de cursar me permitió conocer personas hermosas con las que hoy sigo compartiendo mucho, Vale, Seba y Juli.

A Xime y Fer, que me conocen desde el principio, gracias por compartir tanto el trabajo como la amistad, gracias por todo su apoyo y consejos siempre que los necesité, por todas las charlas, risas, viajes y momentos que vivimos.

A mi directora, Ceci, no puedo más que agradecer todo el apoyo, constancia y paciencia que me tuvo y me tiene siempre, desde el comienzo de este camino recorrido, gracias por dejarme ser parte de este hermoso grupo y confiar en mí.

A Vivi, quien nos acompañó y aconsejó durante la tesis doctoral.

A mis compañeros del Instituto de Virología, con quienes comparto día a día y con quienes he compartido tanto trabajo como charlas, comidas y momentos de distención, gracias.

Gracias a Estela, porque con su trabajo y sus infaltables mates y charlas todo esto fue más fácil.

A las Cátedras de Estomatología de la Facultad de Odontología, ya que sin ellos no hubiera sido posible desarrollar el trabajo; especialmente gracias a las Dras. Silvia López de Blanc e Inés Criscuolo, Dr. René Panico y al Od. Ángel Talavera. A la Cátedra de Anatomía Patológica, Dra. Ruth Ferreyra.

A la comisión de seguimiento y tribunal evaluador, gracias por prestar parte de su tiempo en guiarme y aconsejarme en el desarrollo de la tesis doctoral.

A la dirección del Instituto de Virología, a las autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas- UNC, Dr. Rogelio Pizzi, a la Secretaría de Ciencia y Tecnología y a CONICET por la oportunidad.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I. Introducción</b>	
1. Virus Papiloma Humano .....	16
1.1 Clasificación .....	16
1.2 Organización genómica y proteínas virales .....	17
1.3 Genotipos .....	19
1.4 Historia natural de la infección por HPV .....	20
1.5 Vías de transmisión de HPV .....	21
1.6 Mutaciones de importancia clínica para el desarrollo de la malignidad .....	22
2. HPV y su asociación con cáncer oral .....	24
2.1 Lesiones en la cavidad oral .....	26
2.1.1 Lesiones benignas .....	26
2.1.2 Desórdenes potencialmente malignos .....	26
2.1.3 Lesiones malignas .....	27
3. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	28
3.1 Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	29
3.2 <i>Chlamydia trachomatis</i> y cáncer oral .....	31
4. Virus Herpes Simple .....	32
4.1 Historia natural de la infección por Virus Herpes Simple .....	33
4.2 Virus Herpes Simple y cáncer oral .....	34
5. Marcadores celulares y mecanismos moleculares .....	35
5.1 p53: el guardián del genoma .....	35
5.2 Apoptosis: muerte celular programada .....	36
5.3 Relación de los marcadores celulares y mecanismo moleculares durante la infección por HPV .....	37

5.4 Regulación del p53 y de la apoptosis frente a la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	38
5.4.1 Consecuencias en el proceso de infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	39
5.5 Virus Herpes Simple: su asociación con el p53 y con la apoptosis .....	40
<b>CAPÍTULO II. Objetivos</b>	
1. Objetivo General.....	44
1.1 Objetivos específicos.....	44
<b>CAPÍTULO III. Materiales y Métodos</b>	
1. Estudios en pacientes.....	46
1.1 Población de estudio.....	46
1.2 Obtención de muestra.....	46
1.3 Extracción de ácidos nucleicos (ADN).....	47
1.3.1 Protocolo de extracción de ADN.....	47
1.4 Detección de HPV e identificación de genotipos .....	48
1.4.1 Protocolo de PCR- HPV.....	48
1.4.2 Protocolo de RFLP HPV.....	49
1.5 PCR en tiempo real dirigida a los genes E6 y E7 de HPV16.....	49
1.6 PCR para amplificación del gen E6 de HPV16 .....	50
1.7 PCR para amplificación del gen LCR de HPV16.....	50
1.8 Secuenciación y análisis de mutaciones puntuales de los genes E6 y LCR de HPV16 .....	51
1.9 PCR para amplificación de plásmido críptico de <i>C. trachomatis</i> .....	51
1.10 Detección de HSV e identificación del tipo viral.....	52
1.10.1 Protocolo de PCR HSV1 y 2.....	52
1.10.2 Protocolo de RFLP HSV1 y 2.....	52
1.11 Visualización de productos de PCR.....	53
2. Estudios <i>in vitro</i> .....	53
2.1 Líneas celulares.....	53
2.1.1 Conservación y mantenimiento (sub cultivo)	

de las líneas celulares .....	53
2.2 Generación de línea celular transfectada de forma estable con los genes E6/E7 de HPV16 .....	54
2.2.1 Transfección de plásmido pLXSN16E6E7 en línea celular C33A .....	54
2.2.1.1 Preparación de <i>Escherichia coli</i> competentes .....	54
2.2.1.2 Protocolo de extracción y purificación de ADN plasmídico .....	55
2.2.1.3 Protocolo de transfección estable .....	56
2.3 Titulación de <i>Chlamydia trachomatis</i> por identificación en cultivos celulares de las unidades formadoras de inclusión .....	57
2.4 Titulación de Virus Herpes Simple 1 por ensayo de placa .....	57
2.5 Protocolo de infección por <i>C. trachomatis</i> y HSV1 .....	58
2.6 Determinación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 y 18 .....	59
2.6.1 Protocolo de extracción de ARN .....	59
2.6.2 Retrotranscripción: ARN a ADN complementario (ADNc) .....	60
2.6.3 qPCR dirigida a los genes E6 y E7 de HPV16 y HPV18 .....	61
2.7 Estudio de la localización e intensidad de fluorescencia de la proteína p53 por inmunofluorescencia indirecta .....	62
2.8 Estudio de apoptosis por tinción de TUNEL .....	63
2.9 Análisis estadístico .....	64

## **CAPÍTULO IV. Resultados**

1. Estudios en pacientes .....	67
1.1 Detección de patógenos de transmisión sexual: HPV, <i>C. trachomatis</i> y HSV, en lesiones orales .....	67
1.2 Cuantificación de carga viral de oncogenes E6 y E7 de HPV16 y 18 .....	75
1.3 Estudio de mutaciones puntuales .....	77
1.3.1 Análisis de las secuencias obtenidas de la región	

E6 de HPV16.....	77
1.3.2 Análisis de las secuencias obtenidas de la región	
LCR de HPV16.....	77
2. Estudios <i>in vitro</i> .....	80
2.1 Titulación de <i>C. trachomatis</i> por unidad formadora de inclusión.....	80
2.2 Titulación de HSV1 por ensayo de placa.....	80
2.3 Cuantificación de ADNc.....	80
2.4 Estudio de la expresión de los oncogenes E6 y E7.....	82
2.5 Estudio de la localización e intensidad de fluorescencia de la	
proteína p53.....	85
2.6 Estudio de apoptosis.....	94
<b>CAPÍTULO V. Discusión</b>	
1. Estudios en pacientes.....	103
1.1 Infecciones de transmisión sexual en la cavidad oral:	
HPV, <i>C. trachomatis</i> y HSV.....	103
1.2 Carga viral de los oncogenes E6 y E7 en lesiones orales HPV16.....	111
1.3 Mutaciones puntuales asociadas a la malignidad.....	116
2. Estudios <i>in vitro</i> .....	120
2.1 Marcadores celulares, virales y mecanismos moleculares	
implicados en la carcinogénesis.....	120
3. Conclusiones generales.....	137
<b>CAPÍTULO VI</b>	
Bibliografía.....	139
<b>CAPÍTULO VII. Anexos</b>	
Anexo I: Aprobación del Comité de Ética.....	166
Anexo II: Consentimiento informado para el estudio de muestras de pacientes..	167
Anexo III: Publicación.....	172

## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ARN:** ácido ribonucleico

***C. trachomatis:*** *Chlamydia trachomatis*

**CCC:** cáncer de cabeza y cuello

**hpi:** horas post infección

**HPV:** Virus Papiloma Humano

**HSV:** Virus Herpes Simple

**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

**ITS:** infección de transmisión sexual

**LB:** lesiones benignas

**LGV:** linfogranuloma venéreo

**ORF:** marcos abiertos de lectura

**OSCC:** carcinoma oral de células escamosas

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PMOD:** desórdenes potencialmente malignos

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**Rb:** retinoblastoma

**RFLP:** polimorfismos del largo de los fragmentos de restricción

## RESUMEN

El Virus Papiloma Humano (HPV) representa la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial. En la literatura, los estudios de patógenos de transmisión sexual en lesiones de la cavidad bucal generalmente se limitan a la búsqueda de HPV, por lo que se sabe poco acerca de la presencia y la co- infección con otros agentes de infección como *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) y Virus Herpes Simple (HSV). La infección por *C. trachomatis* puede contribuir a la carcinogénesis por su posible impacto en la estructura, la regulación de genes y el mantenimiento de la célula hospedadora. Por su parte, el HSV participa en la activación de las mutaciones cromosómicas y la sobre-expresión de oncogenes pre-existentes en la mucosa oral, sugiriendo que de esta manera podría contribuir a la incidencia del cáncer de cabeza y cuello.

La progresión al cáncer asociado a las infecciones por HPV, se han relacionado con un aumento en la expresión de los oncogenes virales y degradación de proteína supresora de tumores p53 que muy a menudo resulta en la resistencia de las células transformadas a la apoptosis.

Este trabajo tuvo como propósito estudiar dos aspectos: a) clínico epidemiológico, estudiando 318 muestras de pacientes con lesiones bucales: lesiones benignas, desórdenes potencialmente malignos y carcinomas orales de células escamosas; b) experimental, implementando un modelo *in vitro* de infección con líneas celulares derivadas de cáncer cervical HPV (+) y (-), las cuales fueron co-infectadas con *C. trachomatis* y HSV1. Usando estas líneas, se estudiaron marcadores celulares, virales y mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis como la expresión de los oncogenes E6, E7, localización y degradación de p53 y presencia de apoptosis.

Los resultados mostraron una prevalencia de HPV del 34,3%, *C. trachomatis* en un 16,9% y HSV en un 3%. Los genotipos de HPV más frecuentemente detectados fueron el 6 de bajo riesgo y el 16 de alto riesgo. También se determinó la carga viral de los oncogenes E6 y E7 del HPV 16 y no se encontró relación entre la mayor carga viral y el tipo de lesión, sexo, co- infección con *C. trachomatis* y factores de riesgo convencionales como tabaco y alcohol ( $p > 0,05$ ). Todos estos pacientes estudiados para carga viral fueron negativos para HSV.

Además, se conocen mutaciones puntuales del genoma de HPV16, asociadas a una posible progresión de las lesiones hacia la malignidad. En este trabajo se estudiaron las mutaciones más frecuentes descritas para la región E6 y LCR en las muestras de pacientes HPV16. Ambas mutaciones fueron detectadas en la mayoría de las muestras secuenciadas (18/23 E6 y 6/7 LCR) y en todos los tipos de lesiones.

En relación a los estudios *in vitro*, frente a las co- infecciones de los diferentes agentes estudiados (HPV, *C. trachomatis* y HSV), pudimos determinar que se produce un aumento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 y 18, inhibición de apoptosis y translocación citoplasmática de p53 para su futura degradación, lo cual genera un ambiente propicio para completar el ciclo de vida y la replicación de los agentes infecciosos.

Es necesario profundizar aún más en los mecanismos involucrados en la carcinogénesis asociada a estas infecciones, pero estos primeros resultados nos indican un camino para seguir investigando y estudiando acerca de dichos procesos relevantes, no solo para la salud de los pacientes, si no a un nivel de salud pública en la población general, ya que los resultados obtenidos, tanto en el estudio de pacientes como estudios *in vitro*, nos muestran que las infecciones por los tres agentes patógenos es detectable, circulan en la población de Córdoba en todo tipo de lesiones orales y existe un sinergismo en co- infección que podría favorecer la transformación maligna de las diferentes lesiones, atendiendo a la necesidad de realizar los controles y diagnóstico clínico pertinentes.

## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) represents the most frequent sexually transmitted infection worldwide. In the literature, studies of sexually transmitted pathogens in oral cavity lesions are generally limited to the search for HPV, so little is known about the presence and the co-infection with other infection agents such as *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) and Herpes Simplex Virus (HSV). *C. trachomatis* infection may contribute to carcinogenesis due to its possible impact on the structure, gene regulation and maintenance of the host cell. HSV, for its part, participates in the activation of chromosomal mutations and overexpression of pre-existing oncogenes in the oral mucosa, suggesting that it could contribute to the incidence of head and neck cancer.

The progression of cancer associated with HPV infections has been linked to an increase in the expression of viral oncogenes and degradation of p53 tumor suppressor protein that very often results in the resistance of transformed cells to apoptosis during cell transformation.

This work was intended to study two aspects: a) clinical- epidemiological study, studying 318 samples of patients with oral lesions: benign lesions, potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinomas, b) experimental, optimized *in vitro* model using cancer cell lines HPV cervical (+) and (-) co- infected with *C. trachomatis* and HSV1. With this model we studied cell markers, viral markers and molecular mechanisms involved in carcinogenesis such as the expression of oncogenes E6, E7, location and degradation of p53 and presence of apoptosis.

The results showed a prevalence of HPV of 34.3%, *C. trachomatis* in 16.9% and HSV in 3%. The most frequently detected HPV genotypes were 6 low risk and 16 high risk. The viral load of the E6 and E7 oncogenes of HPV16 in the patient samples was also determined and no relationship was found between the greater viral load and the type of lesion, sex, co-infection with *C. trachomatis* and conventional risk factors such as tobacco and alcohol and ( $p>0,05$ ). All these studied patients for viral load were negative for HSV.

In addition, specific mutations of the HPV16 genome are known, associated with a probable progression of the lesions towards the malignancy. In this study, the most frequent mutations described for the E6 and LCR region in HPV16 patient's samples was studied.

Both mutations were detected in most of the sequenced samples (18/23 E6 and 6/7 LCR) and in all types of lesions.

In reference to *in vitro* study, against the co-infections of the different studied agents (HPV, *C. trachomatis* y HSV), we were able to determine that there is an increase in the expression of the E6 and E7 oncogenes of HPV 16 and 18, inhibition of apoptosis and cytoplasmatic translocation of p53 for future degradation, which generates an environment conducive to complete the life cycle and the replication of infectious agents.

It is necessary to further deepen the mechanisms involved in the carcinogenesis associated with these infections, but these first results indicate a way to continue researching and studying about these relevant processes, not only for the health of patients, but at a level of public health in the general population since the results obtained, both in the study of patients and *in vitro* studies, show us that infections by the three pathogens is detectable, circulate in the population of Córdoba in all types of oral lesions and there is a synergism in co-infection that could favor the malignant transformation of the different lesions, attending to the need to carry out the pertinent controls and diagnosis in time.

# *Capítulo I*

---

Introducción

# INTRODUCCIÓN

## 1- Virus Papiloma Humano

En 1970 se inicia la era de la biología molecular y es Harald zur Hausen quien asocia displasias y cáncer cervical con el Virus Papiloma Humano (HPV- *del inglés Human Papillomavirus*), y logra clonar diferentes genomas virales a partir de distintas lesiones humanas. De este modo comenzó el estudio de agentes virales no cultivables. La caracterización de sus ácidos nucleicos permitió un análisis detallado de su importancia como agente oncogénico (zur Hausen 1991). Fue así que en 1995 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC- *del inglés International Agency for Research on Cancer*) concluyen, más allá de toda duda razonable, que el HPV es la causa necesaria no suficiente para el cáncer cervical.

### 1.1 Clasificación

Históricamente, los virus del papiloma se agruparon junto con los poliomavirus en la familia *Papovaviridae*. Las partículas del virus del papiloma miden alrededor de 55 nm de diámetro, mientras que los poliomavirus son ligeramente más pequeños, unos 45 nm. A partir de esta diferencia de diámetro, la familia *Papovaviridae* fue inicialmente dividida en dos géneros: los poliomavirus (que incluyen poliomavirus y SV40) y los papilomavirus. Sin embargo, estudios comparativos realizados por biología y clonación molecular de su información genética indicaron que había diferencias fundamentales en la organización genómica de estos dos géneros. El reconocimiento de estas diferencias, ha llevado a que papiloma y poliomavirus sean considerados actualmente pertenecientes a diferentes familias (Howley and DR 2001).

Los HPV pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual se divide en 39 géneros diferentes designados cada uno de ellos por una letra del alfabeto griego. Tomando como referencia la secuencia L1 del genoma viral, se define como un género a las secuencias que tengan una identidad nucleotídica mayor o igual al 60%. Dentro de un género, aquellas secuencias genómicas que comparten 60 a 70% de identidad, se denominan especies.

Además, dentro de una especie, aquellas con 71–89% de identidad de secuencia L1 se consideran un tipo. A partir de 2016, se identificaron 205 tipos diferentes de HPV, que fueron incluidos en cinco de los géneros ya definidos, que incluyen los siguientes: 65 Alphapapillomavirus, 51 Betapapillomavirus, 84 Gammapapillomavirus, 4 Mupapillomavirus y un solo Nupapillomavirus. A su vez, se identificaron al menos 19 tipos adicionales que están actualmente pendientes de clasificación. Los HPV con 90-98% de identidad de secuencia L1 se denominan subtipos y aquellos con > 98% de identidad de secuencia L1 se consideran variantes. Podría decirse que los HPV en el género alfa son los de mayor importancia médica dado que están asociados con cánceres de la mucosa cervical y oral, así como con cánceres del tracto anogenital (Harden and Munger 2017).

## 1.2 Organización genómica y proteínas virales

Los papilomavirus tienen una organización genómica similar, comparten al menos 5 genes homólogos, aunque sus secuencias nucleotídicas pueden divergir en más del 50%, (Bernard et al. 2006).

Este virus de tamaño pequeño, muy resistente, posee una cápside de simetría icosaédrica formada por 72 capsómeros, sin envoltura lipídica. Su ADN es una doble cadena circular cerrada superhelicoidal asociado a histonas celulares, en forma de cromatina en las células infectadas (Kalantari and Bernard 2006). Tiene alrededor de 8000 pares de bases (pb) que se organizan en dos grupos: genes de estructura que codifican para las proteínas de la cápside, de expresión tardía (región L), y genes codificadores de las funciones tempranas, que intervienen en la replicación del virus y la transformación celular (región E).

Los diferentes marcos abiertos de lectura (ORF- *del inglés Open Reading Frame*) codifican proteínas que cumplen con las siguientes funciones (Lazo 1999, do Horto dos Santos Oliveira et al. 2003, de Villiers et al. 2004, Taghizadeh et al. 2019) (Figura 1):

**E1:** codifica proteínas necesarias para la replicación extracromosomal y el ciclo viral, tienen actividad helicasa, ya que catalizan el desenrollamiento de la hebra de ADN.

**E2:** codifica para proteínas necesarias para la replicación extracromosomal y el ciclo viral. Además, codifica dos proteínas que inhiben o activan la transcripción de la región E.

El gen E2 puede generar una proteína completa que es un regulador positivo o una proteína que solamente tiene el dominio de unión al ADN y que funciona como represor. Cuando se produce la integración del ADN viral estos dos tipos de proteínas se pierden por delección. Después de la integración, la eliminación de este freno permite la expansión de las células que llevan anomalías genéticas de diferentes tipos.

**E4:** codifica para la proteína que actúa en la maduración y replicación del virus. Induce el colapso de la red de queratina citoplasmática en los queratinocitos antes de la liberación de las partículas virales.

**E5:** oncogén viral con débil capacidad transformante.

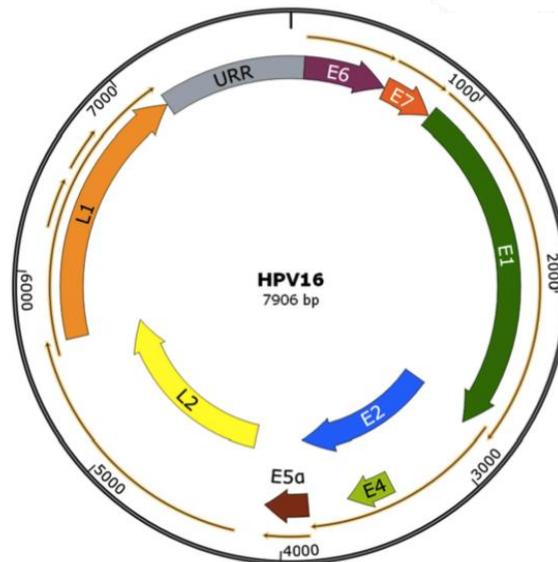
**E6:** oncogén viral. Permite la replicación del virus, con capacidad de immortalizar y transformar la célula. Este gen codifica para la proteína E6 que actúa con la proteína supresora de tumores p53, resultando en el secuestro de esta última y llevando a su degradación por la vía de la ubiquitina. La unión de la proteína E6 a p53 podría contribuir a la acumulación de mutaciones adicionales que permite entrar al ciclo celular antes que el ADN haya sido reparado, mediante la alteración de puntos de control para la entrada de la célula en G1 y un efecto adicional podría ser la inhibición de la apoptosis por el efecto parcial tanto de p53 como de la proteína retinoblastoma (Rb).

**E7:** oncogén viral. Permite la replicación del virus, con capacidad de immortalizar y transformar la célula. La proteína E7 codificada por este oncogén se une a las proteínas oncosupresoras de la familia Rb. Esta interacción disocia esta proteína del factor de transcripción E2F. El factor E2F libre puede activar genes que podrían promover la progresión del ciclo celular y la proliferación celular induciendo inestabilidad genómica (aneuploidía)

**L1:** este gen codifica para la proteína mayor de la cápside; se sintetiza en estadios tardíos de la replicación y contiene los epítopes neutralizantes y la secuencia codificante; es una de las más conservadas entre los diferentes tipos de HPV.

**L2:** este gen codifica para la proteína menor de la cápside. Interactúa con L1. Interviene en el ensamble viral. Interactúa con actina y tubulina. Al igual que L1 se sintetiza en estadios tardíos de la replicación.

**LCR/URR:** región no codificante. Tiene numerosos sitios de unión para activadores y represores de la transcripción. Es la región más variable del genoma del HPV



**Figura 1.** Organización genómica de HPV16. Figura extraída de Christensen. (Christensen 2016).

### 1.3 Genotipos

Genéticamente el virus del papiloma evoluciona muy lentamente con una tasa de mutación de aproximadamente  $2 \pm 0.5 \times 10^{-8}$  por nucleótido por año (Smith et al. 2011). Se cree que esta lenta tasa de mutación se debe a que la polimerasa posee una excelente capacidad correctora. Sin embargo, los polimorfismos de nucleótidos pueden ocurrir por mutaciones al azar y establecerse en una población (Cornet et al. 2012). En la actualidad muchos autores han informado que las mutaciones o recombinaciones son eventos muy raros, sin embargo, la existencia de recombinación en los antiguos linajes, explicaría la evolución no monofilética de los HPV (Angulo and Carvajal-Rodríguez 2007). El proceso evolutivo que da lugar a los diferentes genotipos aún no se conoce, sin embargo se cree que

podría tratarse de un proceso de deriva genética combinada con el efecto cuello de botella (Bernard et al. 2006).

Actualmente se han identificado más de 100 tipos de HPV, de los cuales aproximadamente 40 de ellos tienen tropismo específico por los epitelios mucosos (anogenital- oral) siendo los restantes cutáneos. Los aproximadamente 40 HPV alfa que infectan los epitelios de las mucosas se clasifican como de bajo riesgo (BR), no carcinogénicos (HPV 6, 11, 32, 40, 44, 57, 61, 72, 81); de alto riesgo (AR) carcinogénicos, (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), y de riesgo intermedio (RI) con potencialidad carcinogénica por encontrarse filogenéticamente cercanos a los genotipos de AR, (HPV 26, 42, 53, 54, 68, 69, 70, 71) (Doorbar et al. 2012).

Los HPV BR, por ejemplo HPV6 y HPV11, causan verrugas genitales o hiperplasia epitelial focal oral (enfermedad de Heck) dependiendo del sitio anatómico de infección. Los HPV de AR, como el HPV16 y el HPV18, causan una neoplasia intraepitelial, que puede progresar a carcinoma invasivo en pacientes con diagnóstico de carcinoma epitelial de células escamosas, siendo el carcinoma cervical asociado a HPV AR el cuarto cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo (Zur Hausen 2009). Las infecciones por HPV AR también fueron reveladas en el 95% de los cánceres anales, el 70% de los cánceres de orofaringe, el 60% de los cánceres vaginales, el 50% de los cánceres de vulva y el 35% de los cánceres de pene. El HPV16 es, el genotipo más frecuente detectado en estos tipos de cáncer (Doorbar et al. 2012).

#### **1.4 Historia natural de la infección por HPV**

La infección por HPV, es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes. El HPV presenta un tropismo específico por las células epiteliales y es dependiente del estado de maduración de los queratinocitos, razón por la cual su desarrollo en cultivos celulares es nulo o de escasa recuperación. A medida que estas células se van diferenciando, varía la expresión de los diferentes ORFs. De tal manera que en las capas basales se expresan las proteínas tempranas y luego aparecen las proteínas tardías o estructurales, para finalmente ensamblar las partículas virales en las células más superficiales, próximas a descamarse (Sarkar et al. 2005). Aunque algunos autores

demonstraron la coexistencia de la forma episomal e integrada en el carcinoma cervical (Kristiansen et al. 1994, Park et al. 1997), la mayoría de lo reportado en la literatura científica menciona que el ADN viral está generalmente integrado al genoma, principalmente en las líneas celulares derivadas de carcinomas de cuello uterino. La integración viral no siempre coincide con una lesión de alto grado y no necesariamente siempre es seguida de la expresión de las oncoproteínas (Kalantari et al. 2001, Gallo et al. 2003).

Se ha demostrado que durante el proceso de integración del ADN viral y transformación maligna genital asociada a HPV, pueden perderse algunas porciones de su genoma tales como L1, L2, E1 y E2, mientras que los oncogenes virales E6 y E7 siempre se conservan (Picconi et al. 2000). El gen viral E2 normalmente funciona como un regulador positivo/negativo de la transcripción por lo que se lo ha identificado como el sitio preferido de integración viral ya que es eliminado con más frecuencia que otros sitios. Por lo tanto, la interrupción de la retroalimentación negativa dependiente de E2 sobre el control de la transcripción de E6 y E7 se considera un evento selectivo en el desarrollo y progresión del tumor (Thomas et al. 2006).

### **1.5 Vías de transmisión de HPV**

En relación a las infecciones orales por HPV, la principal vía de transmisión es la vía sexual; las verrugas se transmiten principalmente a través del sexo oral. Estudios previos demostraron que las actividades sexuales orales y un aumento en el número de parejas sexuales aumentan la transmisión oral de HPV, lo que puede conducir a su vez a un aumento de infección viral en la región de la cabeza y el cuello (Tumbam 2019).

La transmisión natural de HPV involucra el contacto físico de la capa superior del epitelio con la piel normal, que, mediante microabrasiones permite ingresar al virus a las capas epiteliales más basales (Doorbar et al. 2012). La liberación de viriones infectivos puede incluir la liberación de filamentos de queratina con proteínas virales E4 y proteasas hospedador / microbianas con la posterior liberación de viriones en el sitio donde se produjo la microabrasión durante las relaciones sexuales, ya sea por infecciones genitales,

orales y/o anales, como así también por irritaciones mecánicas de la mucosa oral (Christensen 2016).

Otra de las vías de transmisión descritas es la autoinoculación, dado que la infección por HPV es localizada y no sistémica, es probable que se produzca autoinoculación (en ausencia de sexo oral) de la región genital a la región oral (Tumbam 2019).

### **1.6 Mutaciones de importancia clínica para el desarrollo de la malignidad**

A lo largo de los años se analizaron muchos genes virales tales como L1, L2 y los oncogenes virales E6 y E7. Los genes L1 y E6 despertaron interés porque se los ha vinculado con cambios en la respuesta inmune del hospedador y en el potencial oncogénico, respectivamente; probablemente debido a diferencias en sus secuencias nucleotídicas (Cornet et al. 2012).

Por otra parte, la región LCR es reconocida por contener una amplia información filogenética que permite distinguir los diferentes sublinajes (Picconi et al. 2000). La misma, contiene varios sitios de unión para la regulación de la transcripción viral de la proteína E2 y los factores de transcripción celular que regulan tanto de modo positivo (AP1, Sp1, NF1, Oct-1, Tef-1) o negativo (YY1, CDP) su función. Los factores de transcripción YY1 y CDP son represores responsables de silenciar la transcripción del promotor de E6 (Ho et al. 1993; Ciapponi et al. 2011).

Es posible, por lo tanto, que YY1 pueda servir para ayudar a mantener menores niveles de transcripción del HPV, mientras que los cambios en la transcripción o mutaciones en los sitios de unión del YY1 podrían resultar en niveles elevados de la expresión de los genes virales. Aunque el factor de transcripción YY1 es una proteína multifuncional y puede actuar como represor, activador o iniciador, es considerado como un represor de la actividad transcripcional del HPV16 (O'Connor et al. 1996). En este sentido, se describe que la posición nucleotídica 7521 de la región LCR del genoma viral, es el sitio de unión del factor de transcripción YY1, por lo cual, una mutación puntual en esa posición imposibilita la unión de este regulador (Zhe et al. 2019).

A pesar de que la infección por HPV16 es la más frecuente y que pertenece al grupo denominado genotipos de AR, solamente una fracción de mujeres infectadas con HPV16

desarrolla cáncer cervical. Teniendo en cuenta que la oncogénesis es multifactorial; en relación a la responsabilidad del virus, el proceso de malignidad se debe a que la interrupción de los mecanismos reguladores normales del ciclo celular, conducen a la aparición de poblaciones de células que forman una lesión. En esta etapa, las lesiones revierten o desaparecen con frecuencia y el HPV se vuelve indetectable mediante pruebas moleculares en 1 a 2 años. En sólo una pequeña porción (10 a 20%) de las personas infectadas, las lesiones progresan para desarrollar procesos malignos y premalignos asociados con la infección viral (Stanley 2010, Burd 2016). Las oncoproteínas E6 y E7 son las responsables de la transformación maligna del epitelio al interactuar con el ciclo de regulación de las proteínas p53 y Rb respectivamente (Kammer et al. 2002).

La expresión de los genes de HPV está dada por un promotor E6 que es activado por la caja TATA y un sitio de unión Sp1 regulado por un circuito de retroalimentación ejecutado por las proteínas E2. Este promotor es precedido por un potenciador que activa la transcripción específicamente en células epiteliales en sinergismo con diferentes factores de transcripción, con AP-1 jugando un rol principal en la especificidad epitelial (Kalantari and Bernard 2006).

Las variantes del virus pueden interactuar diferencialmente con los factores genéticos del hospedador posiblemente alterando el curso de la enfermedad. Las variantes HPV16 E6 pueden diferir en su habilidad para degradar la proteína p53, mientras los alelos polimórficos de p53 pueden proveer mayor o menor susceptibilidad al producto oncogénico viral. Las variantes de E6 pueden diferir en su inmunogenicidad al generar diferentes péptidos para la presentación de las moléculas HLA polimórficas, a las células T específicas. Algunos trabajos han informado que la variante T350G está asociada a un incremento en el riesgo de desarrollo de una infección persistente que favorecería la progresión al cáncer (Zehbe et al. 2003, Zhe et al. 2019). Una posible hipótesis para este fenómeno estaría asociada a la respuesta celular inmune; ya que diferentes haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad pueden reconocer a las variantes de E6 con diferente eficiencia, lo cual podría resultar en la persistencia o erradicación de la infección viral (Zehbe et al. 2003). Resultados anteriores de nuestro grupo de investigación, también reportaron la presencia de las diferentes variantes y cambios puntuales asociados a

malignidad, en muestras endocervicales de la población de la ciudad de Córdoba (Mosmann et al. 2015).

## **2. HPV y su asociación con cáncer oral**

En 2007 la IARC concluyó que existían pruebas suficientes del papel carcinogénico del HPV16 en los tumores orofaríngeos, y estimó que el 31% de los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas (OSCC, *del inglés Oral Squamous Cell Carcinoma*) se atribuyen a una infección por este virus (IARC. 2007). Sin embargo, la sola detección de ADN viral no es suficiente para clasificar un OSCC como impulsado por HPV, ya que la presencia de ADN podría simplemente reflejar una infección transitoria y no un proceso oncogénico conducido por el virus (Taberna et al. 2017).

El cáncer bucal generalmente se define como una neoplasia maligna en cavidad oral, que se manifiesta en las siguientes áreas: labio, mucosa bucal, crestas alveolares inferiores y superiores, gingiva retromolar, orofaringe, piso de la boca, paladar duro y los dos tercios anteriores de la lengua. El OSCC es la neoplasia epitelial más común en la cavidad oral y constituye más del 90% de las neoplasias orales, a su vez, más del 90% de éstas, son el resultado de la transformación de lesiones preexistentes denominadas desórdenes potencialmente malignos (PMOD, *del inglés Potentially Malignant Oral Disorder*). El OSCC puede ser tratado cuando se diagnostica tempranamente, sin embargo, puede ocurrir que se generen tumores primarios en varios sitios de la cavidad bucal, sugiriendo un desarrollo de tumores multifocales. (Noonan and Kabani 2005, Hillbertz et al. 2012).

Dada las similitudes morfológicas y fisiológicas de la mucosa genital y bucal, esta última también es susceptible a diferentes ITS, debido a que durante la relación sexual oral-genital, se producen microabrasiones en las mucosas que facilitan la entrada del HPV (Hillbertz et al. 2012).

Los factores etiológicos reconocidos de riesgo de desarrollo de OSCC en cavidad oral, son el consumo de tabaco y alcohol. Otros factores de riesgo incluyen el consumo de marihuana e historial de infección cervical por HPV, entre otros (Hillbertz et al. 2012). Por lo tanto, las diferencias en la exposición a los factores de riesgo y las diferentes prácticas

sexuales podrían explicar, en parte, las diferencias en las frecuencias observadas en las regiones geográficas y en las distintas décadas. (Proia et al. 2006, Hillbertz et al. 2012).

El número de personas que consumen tabaco difiere significativamente según el área geográfica. Por ejemplo se ha observado una notable disminución del consumo de tabaco en América del Norte y Europa del Norte entre los años 1980 y 2012 (Ng et al. 2014). El condensado de humo de tabaco contiene sustancias que actúan como iniciadores y promotores de la carcinogénesis. El riesgo de desarrollar cáncer por fumar sigue siendo significativo hasta aproximadamente cinco años después de dejar de fumar, pero más allá de ese tiempo, el riesgo disminuye (Collins 1996).

Por su parte, el estudio del efecto aislado del uso del alcohol, se suele tornar dificultoso, debido a que la exactitud del consumo de alcohol declarado por el paciente es deficiente, en parte porque la aceptación social del abuso de alcohol es inferior a la del consumo de tabaco (Ide et al. 2008). Sin embargo, la correlación entre el uso de alcohol y el desarrollo de cáncer oral se ha confirmado, y el uso excesivo de alcohol, especialmente sumado con el consumo excesivo de tabaco, es una combinación considerada un factor de riesgo importante para desarrollo del cáncer en la cavidad oral (Hillbertz et al. 2012).

Nuestro conocimiento actual del proceso carcinogénico desde la infección hasta el cáncer de cabeza y cuello aún es limitado y, en su mayoría, se extrapola del modelo de cáncer cervical (Pai and Westra 2009). Sin embargo, contamos con antecedentes locales de detección de HPV en lesiones de la cavidad bucal, en los cuales se ha detectado ADN viral en diferentes tipos de lesiones (Venezuela et al. 2013) y en un menor porcentaje, en la población con mucosa sana elegida al azar (Criscuolo et al. 2018).

El revestimiento mucoso de las amígdalas y las criptas amigdalinas permite el paso directo no solo de las células inmunitarias sino también de patógenos como el HPV. Cuando la infección por HPV no se elimina, su persistencia puede conducir a una lesión precancerosa que, si no retrocede (dependiendo de las características del hospedador, del virus y cofactores), eventualmente progresará a un carcinoma invasivo. Las infecciones persistentes pueden progresar a carcinoma invasivo dentro de los 10 años, sin embargo, la mayoría de estas infecciones se resuelven en uno o dos años (Taberna et al. 2017).

## **2.1 Lesiones en cavidad oral**

### **2.1.1 Lesiones benignas**

El HPV está involucrado en la patogenia de varias lesiones benignas (LB) que se desarrollan en la cavidad oral, especialmente verruga vulgar, papilomas escamosos e hiperplasia epitelial focal. Todas estas son lesiones papilares de crecimiento exofítico que pueden ocurrir de manera única o múltiple y con una superficie lisa o verrugosa de color blanco, rosado o rojo, según el grado de queratinización de la lesión en sí (Candotto et al. 2017).

Los papilomas de células escamosas son los tumores benignos más comunes del epitelio oral. Sin embargo, se agrupan junto con la hiperplasia epitelial benigna, que son cambios reactivos a la lesión en lugar de la neoplasia verdadera. Las manifestaciones más comunes de los papilomas de células escamosas ocurren con mayor frecuencia en niños y adultos de entre 40-50 años de edad (Syrjanen 2018).

Estas lesiones asintomáticas pueden desarrollarse en cualquier parte de la mucosa oral, pero con mayor frecuencia a nivel de la lengua, el paladar blando y los labios. En la mayoría de los casos, a excepción de la hiperplasia epitelial focal, tienen un perfil clínico muy similar, por lo que el diagnóstico se basa en la histología. En el examen histológico, los aspectos similares a una moneda se caracterizan por la proliferación epitelial policlonal, la coilocitosis, que corresponde al efecto patognomónico del virus dentro la célula hospedadora y la disqueratosis. En condiciones benignas relacionadas con HPV, los genotipos de bajo riesgo, como el HPV 2, 4, 6, 11, 13, 32, se encuentran con mayor frecuencia, aunque también se han aislado genotipos de alto riesgo en este tipo de lesiones (Candotto et al. 2017).

### **2.1.2 Desórdenes potencialmente malignos**

En el contexto de la transformación maligna de los PMOD, aún se debate el papel oncogénico de HPV en este tipo de lesiones (De Vuyst et al. 2009). Se ha investigado la hipótesis de un rol de los genotipos de HPV de alto riesgo en la promoción de la carcinogénesis en presencia de PMOD, considerando que las proteínas oncogénicas E6 y E7 actúan en una etapa muy temprana de la carcinogénesis, lo que aumenta

significativamente la capacidad de la célula epitelial de duplicarse mediante el bloqueo de las vías apoptóticas.

Los PMOD más comunes son la leucoplasia oral (OL), la leucoplasia verrugosa proliferativa (PVL), la eritroplasia oral (OE) y el liquen plano oral (OLP) (Candotto et al. 2017). En relación con OL, el trastorno más frecuente entre los PMOD y, por lo tanto, el más investigado en la literatura, la evidencia actual sugiere que OL muestra un mayor riesgo de infección por HPV con respecto a la mucosa clínicamente sana, con una prevalencia de alrededor del 20%, sin diferencias significativas en la presentación clínica (Termine et al. 2012). Sin embargo, hasta el momento se cree que el papel etiológico del HPV en las primeras etapas de la carcinogénesis oral parece bastante modesto (Candotto et al. 2017).

### **2.1.3 Lesiones malignas**

La neoplasia maligna más común de la cavidad oral es el OSCC; esta enfermedad se caracteriza por una fuerte agresión local y un mal pronóstico. Estudios posteriores presentaron hipótesis iniciales sobre un posible papel etiológico del virus en la carcinogénesis oral y orofaríngea, que se remonta a principios de la década de 1980, incluyendo el tropismo epitelial del virus, el papel etiológico confirmado del HPV de alto riesgo en los OSCC en casi todos los cánceres de cuello uterino y en aproximadamente el 40% de los casos de OSCC y las similitudes histológicas entre el epitelio de las dos membranas mucosas. A pesar de las similitudes histológicas de los dos epitelios, se debe enfatizar que el ambiente del cuello uterino es mucho más receptivo a la presencia del virus que todos los otros sitios anatómicos (Candotto et al. 2017).

En los últimos cinco años, la literatura científica ha distinguido dos subtipos de tumores diferentes, según los factores de riesgo, el sitio anatómico y el comportamiento biológico de las lesiones. El primer modelo está asociado con factores de riesgo conocidos (el hábito del consumo de tabaco y alcohol), que se manifiestan principalmente en hombres mayores (generalmente, mayores de 60 años), que afectan a toda la cavidad oral y tienen una tendencia epidemiológica decreciente, aunque sin reducciones sustanciales en la mortalidad. El segundo modelo, sin embargo, se manifiesta en personas jóvenes (por

ejemplo, <40 años), predominantemente hombres, es independiente de los factores de riesgo tradicionales y se correlaciona con las prácticas sexuales (por ejemplo, número de parejas, edad de inicio de las relaciones sexuales, prácticas sexuales orogenitales). Afecta principalmente a los sitios orofaríngeos (por ejemplo, pilares palatinos, amígdalas, base lingual, cara inferior del paladar blando) (Szarka et al. 2009).

La evidencia científica disponible para la orofaringe es, por lo tanto, diferenciada de aquellas disponibles para la cavidad oral. El OSCC de la orofaringe está más estrechamente relacionado con la infección por HPV de alto riesgo, mientras que el OSCC de la boca no ha demostrado una relación sólida, de hecho, el HPV tiene un papel más marginal en esta patología. El carcinoma verrugoso (VC) es una rara variante clínico-histológica de OSCC (<5% de los casos de cáncer oral) caracterizada por un alto grado de diferenciación, agresión reducida, crecimiento lento y poca tendencia a la difusión metastásica a menudo asociada con una PVL pasada. Sin embargo, el papel de HPV en la patogénesis de VC no está del todo claro, los pocos datos en la literatura indican asociación con ambos genotipos virales, de alto y de bajo riesgo (D'Souza et al. 2014, Candotto et al. 2017).

### **3. *Chlamydia trachomatis***

La preponderancia de la evidencia muestra que casi todos los cánceres de cuello uterino y muchos cánceres orofaríngeos se deben a una infección por HPV. Sin embargo, solo una pequeña proporción de mujeres infectadas con HPV, incluso las variantes de alto riesgo como 16 y 18, progresan a cáncer invasivo. Se ha postulado que la co- infección por *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) es un posible cofactor que inclina el equilibrio de la infección por HPV hacia la oncogénesis (Jenkins et al. 2015).

Las *Chlamydias* son patógenos bacterianos intracelulares obligados gram- negativos responsables de una gama de enfermedades de importancia clínica y de salud pública. *C. trachomatis* tiene un genoma relativamente pequeño, comparado con el resto de las bacterias. El mismo está compuesto por un único cromosoma de  $1,03 \times 10^6$  pb y un plásmido de 7500 pb, el cual puede hallarse hasta en 10 copias por célula bacteriana dependiendo del estadio de desarrollo. Hasta el momento, se desconoce su funcionalidad, pero se ha estudiado su composición y se sabe que el mismo contiene ADN no codificante

y 8 ORFs que codifican para 8 proteínas. Aún así, se lo denomina plásmido críptico. Cabe destacar, que se han aislado y clonado cepas libres de plásmido, lo que sugiere que el mismo no es indispensable para que las *Chlamydias* completen su ciclo de vida.

En el año 1998 se obtuvo la primera secuencia genómica completa de *C. trachomatis*. En la actualidad, se cuentan con más de 69 genomas completos, que abarcan diversidad temporal y geográfica (Stephens et al. 1987). Los aislamientos de *C. trachomatis* están clasificados en tres biovars y 21 genotipos (Xia and Xiong 2014). Los biovars son Ocular, Genital y Linfogramuloma Venéreo (LGV) y se dividen de acuerdo a su tropismo tisular, la patogénesis que producen en humanos y animales de laboratorio y sus características en los cultivos celulares (Whitman 2001).

Los genotipos se denominan con una letra mayúscula de la A a la L y se clasifican de acuerdo a la variabilidad de la secuencia del gen *ompA* que codifica para la proteína mayor de membrana externa (MOMP). Esta clasificación coincide con la basada en las diferencias antigénicas de la MOMP que divide a las diferentes cepas de *C. trachomatis* en serotipos o serovares. Distintas sero-variantes de *C. trachomatis* causan una variedad de enfermedades, como tracoma cegador (serovares A - C), infecciones del tracto urogenital y conjuntival en adultos que conducen a uretritis, cervicitis y proctitis, inclusive infecciones respiratorias y conjuntivales en recién nacidos (serovares D - K) y sistémicas como la enfermedad del linfogramuloma venéreo (LGV) (serovares L1 - L3) (Xia and Xiong 2014). En relación a la prevalencia local de *C. trachomatis*, hemos detectado en mucosa genital, un 6,9% en mujeres embarazadas (Kiguen et al. 2019), 7,3% en infértiles (Monetti et al. 2013) y 10% en pacientes masculinos con prostatitis (Motrich et al. 2006). Por otro lado, no existe bibliografía que aporte datos acerca de la prevalencia de *C. trachomatis* en cavidad oral en nuestra región; sin embargo, reportamos evidencia de la presencia de *C. trachomatis* en una muestra de lesión oral asociada a abuso sexual (Kiguen et al. 2014).

### **3.1 Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis***

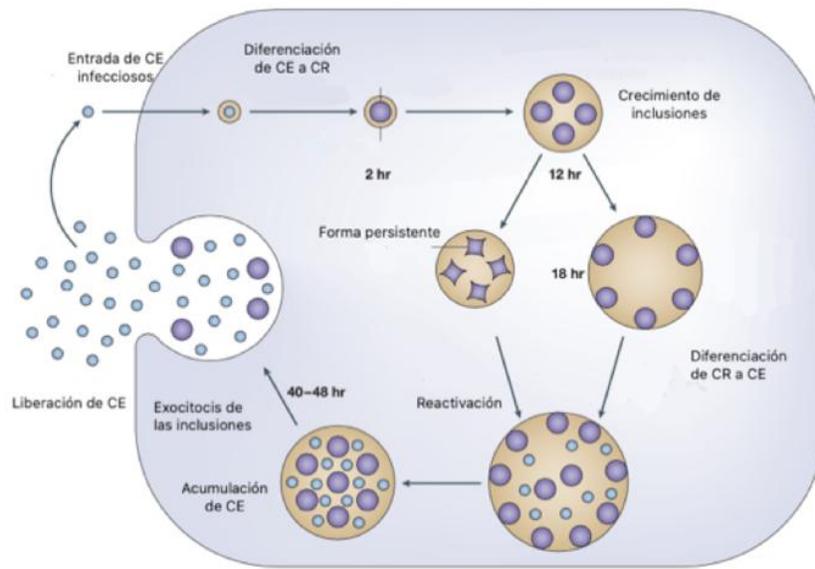
Las *Chlamydias* experimentan un ciclo de desarrollo bifásico único, durante el cual se pueden hallar dos morfologías distintas: cuerpo elemental (CE) y cuerpo reticulado (CR). El CE es extracelular, de pequeño tamaño (300 nm de diámetro) y representa la

---

partícula infectiva y el CR es no infeccioso, de mayor tamaño ( $500 \pm 1600$  nm), metabólicamente activo e intracelular.

El ciclo de desarrollo se inicia con la endocitosis de los CE mediada por receptores de naturaleza proteica o glucosaminoglucanos de las células eucariotas. Los CE quedan dentro de vacuolas intracitoplasmáticas denominadas inclusiones, las cuales no se fusionan a los lisosomas debido a un cambio en la membrana de los CE que bloquean este evento. Transcurridas 8 horas desde el ingreso de los CE a la célula, los mismos se diferencian y se transforman en CR. Los CR se multiplican por fisión binaria expandiendo el tamaño de la inclusión. A las  $24 \pm 48$  h, dependiendo de la especie, los CR se transforman en CE, metabólicamente inactivos e infecciosos. Luego de 72 horas post-infección, los CE son liberados por lisis celular para infectar las células vecinas (Figura 2) (Dautry-Varsat et al. 2005).

Los CE se caracterizan por su resistencia a los factores físicos y químicos en el medio extracelular. Esta resistencia es una consecuencia de la rigidez de la envoltura, que es osmóticamente estable y poco permeable, y también es una consecuencia de la reducida área superficial de los CE en comparación a los CR. Por lo tanto, los CE se encuentran bien adaptados para la supervivencia extracelular prolongada. En todas las etapas de la infección, la *Chlamydia* transloca las proteínas efectoras directamente a las membranas y el citoplasma del hospedador para la manipulación de las funciones de las células infectadas, incluidas las vías de transducción de señales. Las *Chlamydias* pueden invadir la mayoría de las células cultivadas, sugiriendo que los receptores que facilitan la invasión son ubicuos o que son capaces de usar múltiples receptores. Se cree que la unión es un proceso de dos pasos para algunas especies, que implica una interacción reversible inicial entre el CE y la célula hospedadora mediada por proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), seguida de una unión irreversible de alta afinidad a un receptor secundario (Nguyen et al. 2011).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*. Figura extraída y modificada de Brunham. (Brunham and Rey-Ladino 2005).

### 3.2 *Chlamydia trachomatis* y cáncer oral

Se han observado asociaciones positivas entre la infección por *C. trachomatis* y el carcinoma de células escamosas del cuello uterino o sus lesiones precursoras. Por analogía, se propone que la infección por *C. trachomatis* también puede ser un cofactor para los OSCC asociados con HPV. Dado que, tanto *C. trachomatis* como HPV son organismos intracelulares obligados, prefieren tejidos similares y se transmiten por contacto sexual, no es sorprendente que puedan coexistir dentro de un solo individuo (Bhatla et al. 2013).

La infección por *C. trachomatis* puede contribuir a la carcinogénesis por su posible impacto en la estructura, la regulación de genes y el mantenimiento de la célula hospedadora. Las células infectadas experimentan una falla epitelial sustancial, rupturas bicatenarias de ADN aumentadas y no reparadas debido a las especies reactivas de oxígeno inducidas por *C. trachomatis*, señalización oncogénica incrementada, proliferación continua e inhibición de la apoptosis. (Chumduri et al. 2013, Kun et al. 2013).

Las principales dianas tisulares tanto de *C. trachomatis* como de HPV son las células epiteliales que recubren las superficies mucosas, y dichos tejidos son mediadores

importantes de la respuesta inmune del organismo (Burd 2003). La infección por *C. trachomatis* puede llevar a una inflamación crónica persistente, que se asocia con una rápida división celular, reparación debilitada del ADN, estrés oxidativo, aumento de los niveles de prostaglandinas y citoquinas, estimulación de la vía inflamatoria / regulación positiva y oncogénesis. Como la inflamación causada por la infección se ha relacionado con el 15-20% de los cánceres cervicales, estos datos apoyan la hipótesis de que la infección por *C. trachomatis* puede promover un ámbito propicio para la oncogénesis. Los datos recopilados hasta la fecha apuntan a *C. trachomatis* como un co- factor candidato prometedor en la carcinogénesis oral (Jenkins et al. 2015).

#### 4. Virus Herpes Simple

La mayoría de los virus humanos responsables de los principales cuadros de afectación orofacial son virus de tipo ADN, cuyas infecciones son adquiridas durante la infancia o en la adolescencia a través del contacto con sangre, saliva o secreciones genitales (Scott et al. 1997).

Los herpesvirus son los virus tipo ADN más importantes en la patología oral y adquieren especial relevancia cuando infectan a sujetos portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) o a sujetos con cuadros de inmunodepresión.

La familia *Herpesviridae*, contiene únicamente el género Herpesvirus. Éstos tienen en común una morfología típica con una cápsula icosaédrica de 162 capsómeros, a su vez se rodea de un tegumento que contiene entre 15 y 20 proteínas y que está en contacto directo con una envoltura que contiene numerosas glicoproteínas, lo cual los define como virus envueltos. El genoma comprende una única molécula de ADN de 120 a 250 kpb. Dentro de las 8 especies de herpesvirus existen tres subgrupos:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . El subgrupo alfa, conocido como la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, incluye los virus herpes simple 1 (HSV1), herpes simple 2 (HSV2) y varicela-zoster (VZV). El grupo beta o subfamilia *Betaherpesvirinae*, incluye citomegalovirus (CMV), el herpesvirus tipo 6 y el herpesvirus tipo 7. La subfamilia *Gammaherpesvirinae* incluye el virus Epstein-Barr (EBV) y herpes virus 8 (HHV8) o denominado también herpesvirus del Sarcoma de Kaposi (SKHV) (Millar and Troulis 1994).

El HSV1 produce una infección mucocutánea frecuente de la boca. La mayoría de las infecciones son leves, pero pueden ocurrir complicaciones potencialmente mortales, como encefalitis herpética en el neonato y en el adulto. La transmisión de HSV1 a personas susceptibles puede ocurrir durante el contacto directo con lesiones, o con secreciones orales o genitales infectadas inclusive de un portador asintomático. Si bien históricamente el HSV1 generalmente se adquirió en la primera infancia, la seroprevalencia entre los jóvenes de 14 a 19 años en los Estados Unidos ha disminuido significativamente, del 39% al 30%, durante la última década (Ramchandani et al. 2016).

#### **4.1 Historia natural de la infección por Virus Herpes Simple**

Los herpesvirus comparten genes homólogos e incluso bloques de secuencias conservadas que les permiten traducir proteínas, las cuales los caracterizan como miembros de dicha familia. Se han descrito siete bloques de genes conservados que se localizan en el centro del genoma. A pesar de que la latencia es una característica que comparten todos los herpesvirus, los genes responsables de dicha capacidad no se encuentran dentro de los núcleos de genes conservados. El herpesvirus puede actuar como patógeno humano, con un ciclo lítico rápido y con la capacidad de invadir neuronas sensoriales. En este sistema se produce una restricción de la expresión del genoma viral y se establece la fase de latencia. En estados de latencia, HSV1, HSV2 y VZV residen en los ganglios de los nervios sensitivos y en los monocitos. Estos períodos de latencia pueden alternarse con otros periodos de reactivación, en los cuales el virus puede ser transportado a través del axón hasta la periferia, produciendo una infección lítica a nivel de las células epiteliales (Scully et al. 1991). Un trauma físico, el estrés, períodos de inmunosupresión y radioterapia pueden desencadenar dicha reactivación (Pousa Castro and Bascones Martínez 2011).

La infección primaria ocurre a través de los ojos o de alguna pequeña herida en el epitelio nasal, bucal, o incluso la piel. Inicialmente, esta infección es asintomática, aunque podrían producirse algunas lesiones vesiculares menores y locales. A partir de la infección primaria, el virus llega a las terminales nerviosas sensoriales periféricas para, mediante transporte retrógrado a través del axón, llegar a los ganglios sensoriales e infectar el Sistema Nervioso Central donde permanece de forma latente una vez desaparecida la

expresión proteica viral (Pousa Castro and Bascones Martínez 2011).

La infección primaria o la reactivación viral pueden manifestarse sin síntomas o ser sintomáticas con la aparición de lesiones ulcerativas o vesiculares en la mucosa oral y genital. Por lo tanto, se ha sugerido que las infecciones orales y genitales por HSV pueden ser factores predisponentes para la infección por HPV. Los posibles mecanismos incluyen que la infección por HSV permite un mejor acceso del HPV a la capa de células basales para el establecimiento de su infección. Alternativamente, la replicación de HSV en los tejidos donde también se replica el HPV puede influir directa o indirectamente en la persistencia y / o las actividades oncogénicas del HPV. *In vitro*, se ha demostrado que el HSV altera aspectos del ciclo de vida del HPV tras la co- infección (Guidry and Scott 2017).

#### **4.2 Virus Herpes Simple y cáncer oral**

Se ha estudiado la participación del HSV en el carcinoma oral y se encontró que su prevalencia en lesiones tanto malignas como potencialmente malignas en la cavidad oral es aproximadamente del 30% (Cox et al. 1993). El HSV participa en la activación de las mutaciones cromosómicas y la sobreexpresión de oncogenes preexistentes en la mucosa oral, sugiriendo que de esta manera podría contribuir a la incidencia del cáncer de cabeza y cuello (Flaitz and Hicks 1998).

El HSV1 se ha sugerido como un factor de riesgo en el desarrollo de tumores malignos humanos en asociación con el tabaco y el alcohol. La persistencia del virus en la mucosa oral y su capacidad para estimular la síntesis de ADN del hospedador y las reparaciones durante la reactivación sugieren que puede contribuir a la progresión de la lesión al carcinoma oral (Starr et al. 2001).

La presencia de antígenos del HSV1 y ARN complementario al ADN del HSV1 en el tejido tumoral de carcinomas orales, pero no de mucosa normal, es la evidencia más sólida de una participación del HSV en el carcinoma oral. A su vez, el HSV1 podría actuar de forma sinérgica con los componentes del tabaco para producir lesiones en la cavidad oral como así también el desarrollo de carcinomas orales (Jain 2016).

## 5. Marcadores celulares y mecanismos moleculares

### 5.1 p53: *el guardián del genoma*

Hace casi 40 años, mientras se estudiaba la inducción de tumores por pequeños virus de ADN, varios grupos se encontraron con una proteína no viral con una masa molecular aparente de 53KDa, que inmunoprecipitó junto con la proteína de antígeno T grande del virus del simio 40 (SV40). Esta proteína también se identificó en la mayoría de las células transformadas infectadas con el virus de leucemia murina de Abelson (A-MuLV). Durante muchos años no se conoció el mecanismo de acción de p53, por lo cual no se supo si era un oncogén o un supresor de tumores. Finalmente, se determinó que WTp53 (*del inglés Wild Type*) es un gen supresor de tumores, y dado su función se lo denominó "guardián del genoma" (Lane 1992).

WTp53 actualmente bien conocida, se activa ante diversas señales de estrés y regula varias vías celulares que determinan el destino celular, como la detención del ciclo celular, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis (Brosh and Rotter 2009).

En relación a infecciones virales, se conoce que estas provocan un estrés celular, y es por ello que no sorprende que las células infectadas alberguen WTp53 activada y estabilizada (Sato and Tsurumi 2013). En consecuencia, para obtener una replicación y propagación exitosas, los virus utilizan diferentes estrategias para manejar sus células anfitrionas y manipular el rol de p53 como guardián del genoma. Diferentes familias virales han desarrollado sitios de unión a proteínas y otros mecanismos como la degradación proteosomal para secuestrar o interferir con las funciones de p53. Por ejemplo, para propagarse, algunos virus causan la muerte celular mediada por p53 de la célula hospedadora por diferentes mecanismos, como la lisis celular y varios tipos de muerte celular programada (por ejemplo, apoptosis). Por otro lado, algunos virus promueven la proliferación celular al atenuar la función de p53 y, por lo tanto, pueden favorecer la aparición y el desarrollo de células cancerosas. Cabe destacar que, además de la interacción de p53 con los virus, el desarrollo de cáncer también está asociado con la mutación directa del gen p53. De hecho, p53 está mutado en más del 50% de los tumores humanos. La mayoría de las mutaciones comunes de p53 obtuvieron una función oncogénica en lugar de ser un gen supresor de tumores disfuncional (Aloni-Grinstein et al. 2018).

Como una proteína con actividad de larga duración, incluso en concentraciones extremadamente bajas, la estabilidad de p53 está sujeta a una regulación estricta, principalmente a través de un circuito de retroalimentación negativa autorreguladora que se forma con la ubiquitina ligasa E3 humana doble minuto 2 (HDM2; también conocida como MDM2). La HDM2 cataliza la formación de cadenas de ubiquitina en p53 y, por lo tanto, media la exportación constante de p53 desde el núcleo hacia el citoplasma y su posterior degradación proteosomal (Vogelstein et al. 2000). Tras la inducción de estrés celular, como el daño en el ADN causado por muchas infecciones bacterianas o virales, la expresión de oncogenes o el estrés oxidativo, la p53 se estabiliza rápidamente. Dependiendo de la gravedad del daño en el ADN, p53 inicia rutas de señalización que conducen a la detención temporal del ciclo celular y la reparación celular o desencadena la destrucción de la célula dañada (Siegl and Rudel 2015).

## **5.2 Apoptosis: muerte celular programada**

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, desempeña un papel importante en el desarrollo y homeostasis celular, y en la fisiopatología de muchas enfermedades. Es un mecanismo de muerte celular que ayuda a eliminar las células dañadas y también contribuye a la eliminación de las células infectadas por virus. Si la regulación de la misma es inadecuada, la apoptosis también puede contribuir a diversas enfermedades, como la autoinmunidad y el cáncer (Yuan et al. 2012).

La maquinaria de la apoptosis es compleja e involucra muchas vías de señalización. La apoptosis se puede desencadenar en una célula a través de las vías extrínsecas o intrínsecas mediadas por una familia de proteasas denominadas caspasas. Ambas vías convergen para activar las caspasas apoptóticas efectoras que resultan en alteraciones celulares morfológicas y bioquímicas, características de la apoptosis. Generalmente, el balance entre los reguladores de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas es un punto clave crítico para determinar si una célula sufre apoptosis. Las caspasas son fundamentales para el mecanismo de apoptosis, ya que son los iniciadores y ejecutores de la muerte celular.

La desregulación de este proceso de muerte se asocia con la proliferación celular no controlada, el desarrollo y la progresión del cáncer y la resistencia del cáncer a los

tratamientos farmacológicos. Por esa razón, la desregulación de la apoptosis se considera una de las características del cáncer (Pistritto et al. 2016).

Desde el punto de vista morfológico, las células apoptóticas muestran una reducción del volumen nuclear y citoplasmático característico, brotes de la membrana plasmática, exposición a la membrana de fosfatidilserina (PS) en el lado extracelular, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, sin embargo la membrana plasmática está intacta durante todo el proceso (Hacker 2000, Saraste and Pulkki 2000).

En la etapa posterior de la apoptosis, algunas de las características morfológicas incluyen ampollas de membrana, modificación ultraestructural de orgánulos citoplasmáticos y pérdida de integridad de la membrana (Kroemer et al. 2009). Por lo general, las células fagocíticas engloban a las células apoptóticas antes de que tenga lugar la aparición de los cuerpos apoptóticos. (Li and Yuan 2008, Pistritto et al. 2016).

### **5.3 Relación de los marcadores celulares y mecanismos moleculares durante la infección por HPV**

En el caso de las infecciones por HPV, para inducir la replicación viral en las células infectadas, el virus utiliza sus proteínas virales E6 y E7 que inhiben la actividad de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb respectivamente (pRb: proteína Retinoblastoma, cuya función principal es la inhibición del ciclo celular cuando las condiciones celulares no son adecuadas, es decir, inhibe la proliferación celular). Por lo tanto, el HPV interfiere con el ciclo celular del hospedador y conduce a la transformación maligna (zur Hausen 1998, Koromilas et al. 2001). En consecuencia, la proteína E6 de los tipos de HPV de bajo riesgo, como el HPV6 y el HPV11, son incapaces de degradar la p53 de manera eficiente, lo que lleva a un fenotipo benigno. Por lo tanto, la proteína E6 interfiere con la regulación de p53 y causa cambios en el ciclo de la célula hospedadora, lo que resulta en divisiones celulares no reguladas y en la inhibición de la apoptosis (Aloni-Grinstein et al. 2018).

De esta manera, es una ventaja para el virus intervenir en las vías apoptóticas, y se ha demostrado que E5 y E6 pueden impedir la apoptosis de las células infectadas. E7 puede actuar de forma pro apoptótica o anti apoptótica, según el tipo de célula y las circunstancias. Si bien no está del todo claro por qué las propiedades pro apoptóticas de las

proteínas víricas pueden mejorar la supervivencia y propagación del virus, es probable que la influencia de cada proteína de HPV en las vías apoptóticas del hospedador esté relacionada con etapas específicas del ciclo de vida del virus (Hanahan and Weinberg 2000, Yuan et al. 2012).

La proteína E6 de HPV es una oncoproteína esencial que ha sido ampliamente estudiada durante las últimas dos o tres décadas; E6 es una proteína pequeña que consta de 151 aminoácidos. El supresor de tumores p53 es el primer objetivo descrito y más conocido de E6. La oncoproteína E6 de los tipos de alto riesgo de HPV interfiere con este proceso, ya que E6 se une a la proteína ligasa asociada a p53 y E6 (E6AP), causando la ubiquitinización y la degradación subsiguiente de p53. Esta pérdida evita que p53 induzca la detención del crecimiento o la apoptosis de las células infectadas (Scheffner et al. 1990).

Además de p53, E6 también interactúa con otras proteínas asociadas que desempeñan una variedad de funciones en la célula. Tras la unión a E6, muchas de estas proteínas se pierden por un proceso de ubiquitinización y degradación mediado por E6AP similar al observado para p53. En cada uno de estos casos, el E6 funciona para reducir la muerte celular al comprometer la integridad de las vías celulares que conducen a la apoptosis. En el contexto del ciclo de vida del virus, la inhibición de la apoptosis es fundamental porque protege a las células infectadas de la eliminación por parte del sistema inmunitario. Esta habilidad también puede prolongar las primeras etapas del ciclo de vida. Durante la carcinogénesis, la expresión de E6 generalmente aumenta, lo que da como resultado células que no sufren apoptosis y que luego son susceptibles a la transformación mediada por E6 y E7 (Yuan et al. 2012).

#### **5.4 Regulación de p53 y de la apoptosis frente a la infección por *Chlamydia trachomatis***

Los patógenos intracelulares, a diferencia de las células tumorales, enfrentan el problema de obtener suficiente energía y nutrientes de su hospedador para un crecimiento exitoso. Para *Shigella flexneri*, *C. trachomatis* y *Salmonella spp*, por ejemplo, se ha descrito que explotan los recursos de sus hospedadores, modulan y re direccionan las rutas metabólicas del mismo (Ojcius et al. 1998). Recientemente, se reportó que p53 restringe el

desarrollo y replicación de bacterias intracelulares mediante la inhibición de la vía de fosfato de pentosa (PPP) en las células hospedadoras (Siegl et al. 2014). Como p53 controla varias vías metabólicas del hospedador, interferir con la actividad o activación de p53 parece ser un evento crucial para todos los patógenos bacterianos que se replican intracelularmente (Siegl and Rudel 2015).

El patógeno intracelular obligado *C. trachomatis* utiliza al hospedador para obtener los nutrientes necesarios, incluidos nucleótidos, aminoácidos, lípidos y azúcares. Un estudio demostró recientemente la degradación de p53 durante las primeras etapas de la infección por *C. trachomatis* como un medio para reprogramar las rutas metabólicas celulares a fin de generar un ambiente favorable para el patógeno (Siegl et al. 2014). La manipulación de p53 por *C. trachomatis*, está dada por la función principal de la desestabilización de p53 para facilitar el suministro de metabolitos y, por lo tanto la replicación bacteriana, en lugar de asegurar la supervivencia de la célula infectada. La dependencia del crecimiento del patógeno en un eje HDM2-p53 funcional enfatiza un papel potencialmente carcinogénico para las infecciones por *C. trachomatis* (Gonzalez et al. 2014, Siegl and Rudel 2015).

#### **5.4.1 Consecuencias en el proceso de infección por *Chlamydia trachomatis***

A pesar del amplio conocimiento de las múltiples funciones de p53, aún no se sabe si p53 está involucrado en la defensa del hospedador frente a las infecciones bacterianas. Actualmente, se postulan tres estrategias posibles mediante las cuales p53 interfiere con la infección bacteriana: modulación de la respuesta inmune, muerte celular y control del metabolismo celular (Komarova et al. 2005).

El daño al ADN del hospedador provocado por las infecciones bacterianas, que a veces es irreparable, induce vías de señalización del hospedador que el patógeno modula, en particular para suprimir la función de p53. Esto asegura la inhibición de la muerte celular inducida por p53 o al menos prolonga la vida útil del hospedador. Además, la disminución de expresión de p53 puede redirigir el metabolismo celular de una manera que es beneficiosa para el crecimiento bacteriano. La configuración del entorno celular para una replicación bacteriana óptima es de importancia crucial para la diseminación exitosa del patógeno y, por lo tanto, se encuentra bajo una alta presión evolutiva. Esto se ha

demostrado para *C. trachomatis*, que se basa en el soporte nutricional de su hospedador y, utiliza el efecto de la degradación de p53 en las vías metabólicas para apoyar el crecimiento bacteriano de la manera más eficiente posible (Siegl and Rudel 2015).

La infección por *C. trachomatis* induce rupturas de la doble cadena del ADN (Chumduri et al. 2013) y acortamiento transitorio de telómeros (Prusty et al. 2013). Tras la detección de rupturas monocatenarias, roturas bicatenarias del ADN o acortamiento del telómero, el p53 supresor de tumores se estabiliza e induce la detención del ciclo celular y la respuesta al daño del ADN, la senescencia celular o la apoptosis (Balint and Vousden 2001).

La inhibición de apoptosis por *C. trachomatis* podría representar un mecanismo que ha evolucionado para ayudar a establecer infecciones crónicas. Se cree que las infecciones crónicas por *C. trachomatis* implican un estado de crecimiento no productivo que predice una asociación estable a largo plazo con cada célula hospedadora infectada. En estas condiciones, el mantenimiento activo de la viabilidad y la longevidad de la célula hospedadora sería ventajoso, y la inhibición de la apoptosis sería una forma en que esto podría lograrse (Byrne and Ojcius 2004).

Como parte de su estilo de vida intracelular, *C. trachomatis* interfiere activamente con la apoptosis de la célula hospedadora para proteger su respuesta. Dado que la señalización de apoptosis defectuosa es un sello distintivo de las células cancerosas y la infección por *C. trachomatis* se ha relacionado con el cáncer de ovario, se sostiene que la inhibición de la apoptosis inducida por *C. trachomatis* puede ayudar a la supervivencia de las células dañadas con tendencia a transformarse en células cancerosas (Siegl et al. 2014).

### **5.5 Virus Herpes Simple: su asociación con el p53 y con la apoptosis**

La infección por HSV1 induce la estabilización de p53 de una manera dependiente del tipo de célula, y p53 se recluta en los compartimentos de replicación del ADN viral en las células infectadas. El papel de p53 en la infección por HSV1 es interesante, porque la estabilización del p53 es uno de los pasos claves en su activación como respuesta a los factores del estrés celular. Sin embargo, la importancia biológica de p53 en la replicación de HSV1 aún no está clara (Maruzuru et al. 2013).

Algunos estudios demostraron que p53 no solo es reclutado para los compartimentos de replicación del ADN del HSV1 nuclear, sino que también se localiza con la proteína de replicación del ADN viral esencial ICP8. Esta redistribución de p53 es específica, ya que otras proteínas nucleares del hospedador no se redistribuyen durante la infección por HSV1. Además, Maruzuru et al. informaron que p53 puede desempeñar un papel tanto positivo como negativo en la replicación del HSV1 en diferentes etapas. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que en el genoma del HSV1 podría existir un elemento sensible al p53, permitiendo que p53 ejerza un control transcripcional sobre el virus, ya sea en la expresión génica y / o replicación del ADN (Hsieh et al. 2014).

Por otro lado, para que un virus produzca cantidades significativas de partículas infecciosas en una célula infectada, necesitará que la célula sea viable durante el mayor tiempo posible y que proporcione los componentes básicos necesarios para replicar su material genético y producir sus proteínas. Se ha informado que los HSV modulan la muerte celular en diferentes tipos de células, ya sea para promover la viabilidad celular para la generación de nuevos viriones o para promover la muerte de células que pueden ser perjudiciales para su replicación, ensamblaje y liberación de partículas virales. También se ha informado que el HSV1 reduce la apoptosis celular en las células epiteliales, a pesar de provocar procesos que involucraron la regulación negativa de la proteína inhibidora de FLICE (c-FLIP), que es un inhibidor de la caspasa-8 que generalmente resulta en la muerte celular (Kather et al. 2010).

Esta aparente discrepancia se atribuyó a la presencia de secuencias de transcripción asociadas a la latencia (LAT), que se ha descrito que actúan como inhibidores de la apoptosis mediada por caspasa-8 (Henderson et al. 2002). Además, durante la infección por HSV, se ha sugerido que los dominios que interactúan con caspasa-8 dentro de la proteína viral HSV1 ICP6 y la proteína viral HSV2 ICP10, se unen a la caspasa -8 y causan la inhibición de la apoptosis (Guo et al. 2015).

La inhibición efectiva, realizada por estos virus, de los mecanismos relacionados con la apoptosis, probablemente permita generar alto rendimiento de la infección y cantidades suficientes de la progenie viral para la diseminación de la infección en células adyacentes y otros tejidos del hospedador (Tognarelli et al. 2019).

Finalmente, la prevalencia de la co- infección HPV- *C. trachomatis* no está claramente definida, ya que ambas infecciones tienen comúnmente un desarrollo asintomático y pueden evolucionar en una infección persistente (Naldini et al. 2019). Por otro lado, en la ciudad de Córdoba no se cuenta con datos de la prevalencia de *C. trachomatis* en la cavidad bucal. Tampoco está claro aún si *C. trachomatis* y HSV favorecerían la transformación maligna, y menos aún, si las co- infecciones HPV- *C. trachomatis*- HSV tienen efectos sinérgicos en el desarrollo de la malignidad, activando los oncogenes E6 y E7 del HPV, necesarios para desarrollar esta transformación (Doorbar et al. 2012).

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, y a fines de aportar datos más certeros de la participación de estas co- infecciones en la malignidad, proponemos como hipótesis que **la co- infección de HPV con otros agentes de ITS como *Chlamydia trachomatis* o Virus Herpes Simple favorece la progresión a la malignidad de diferentes lesiones orales, mediante la sobreexpresión de oncoproteínas de HPV, disminución de la expresión de genes supresores de tumores e inhibición de la apoptosis.**

# *Capítulo II*

---

Objetivos

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo General

Detectar y caracterizar genéticamente al Virus Papiloma Humano en la cavidad oral y profundizar en el estudio de factores asociados y mecanismos de acción con potencial acción sinérgica en la carcinogénesis

#### 1.1 Objetivos específicos:

- ✓ Detectar y caracterizar genéticamente al Virus Papiloma Humano a partir de lesiones orales.
- ✓ Cuantificar las muestras HPV positivas para establecer asociaciones con el tipo de lesión y factores de riesgo convencionales.
- ✓ Analizar las secuencias de los genes E6 y LCR HPV16 para profundizar en el estudio de mutaciones con potencial oncogénico en la cavidad oral.
- ✓ Determinar la presencia de co- infecciones de HPV con *Chlamydia trachomatis* y Virus Herpes Simple en lesiones orales.
- ✓ Utilizar un modelo *in vitro* de co- infección (HPV + *Chlamydia trachomatis* y/o Virus Herpes Simple) para evaluar los mecanismos con potencial acción sinérgica en la carcinogénesis.

# *Capítulo III*

---

Materiales y Métodos

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Estudios en pacientes

### 1.1 Población de estudio

Se estudiaron pacientes mayores de 18 años, que concurrieron al servicio de estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba durante el periodo Marzo 2012- Diciembre 2016. Se seleccionaron aquellos pacientes que presentaron algún tipo de lesión de la mucosa bucal. Los pacientes que aceptaron participar de dicho proyecto, firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud "Oulton Romagosa" (RePIS 007) de Córdoba-Argentina, de acuerdo con los principios éticos establecidos en la declaración de Helsinki.

*Criterios de inclusión:* Pacientes mayores de edad de ambos sexos que presentaron algún tipo de lesión bucal visible, compatible o no con HPV.

*Criterios de exclusión:* Pacientes que presentaron algún tipo de lesión oral visible compatible con HSV (por protocolo de bioseguridad de la Cátedra de Estomatología).

### 1.2 Obtención de muestras

Las muestras de lesiones orales fueron tomadas por los odontólogos de la Cátedra de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. Las mismas fueron obtenidas mediante cepillado en la zona de lesión y/o biopsia. Las muestras fueron enviadas al Instituto de Virología "Dr. J.M Vanella" y conservadas a -20°C hasta su procesamiento. Otra parte de la muestra, ya sea de cepillado o biopsia, se utilizó para el análisis anatómico patológico en la Facultad de Odontología y se realizó el diagnóstico según el tipo de lesión presente, clasificando en B, PMOD y OSCC, de acuerdo a criterios establecidos por Woo (Woo 2019).

Los datos clínicos, filiatorios y de hábitos fueron relevados por los odontólogos, al momento de la toma de muestra, mediante anamnesis correspondiente a cada paciente de la

cual se tomaron los datos de la edad y consumo de tabaco y alcohol, para el presente trabajo y por examen clínico estomatológico.

La historia clínica comprende preguntas relacionadas a la edad de inicio del hábito de fumar, la edad al dejar de fumar o los períodos de abandono temporal, la cantidad de cigarrillos / día en los diferentes períodos de vida y la cantidad de tabaco (negro o rubio) expresado como el equivalente en los cigarrillos de filtro rubio. Luego, se calculó el número total de cigarrillos fumados a lo largo de la vida del paciente, de acuerdo con Biondi (Biondi et al. 1998), considerando fumador a la persona que fumaba más de 100,000. En referencia al alcohol, el consumo de al menos una unidad de alcohol por día (1U= 8 a 10 g de etanol) se consideró exposición al alcohol, de acuerdo a Pentenero (Pentenero et al. 2008, Criscuolo et al. 2018).

### **1.3 Extracción de ácidos nucleicos (ADN)**

La extracción de ADN de la muestra del paciente se realizó utilizando el kit comercial de extracción de Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante, que se describe a continuación:

#### **1.3.1 Protocolo de extracción de ADN**

1. A cada tubo de reacción de 1,5 mL que contenía 200  $\mu$ L de la muestra, se le adicionó 20  $\mu$ L de Proteinasa K y 200  $\mu$ L de “binding buffer”.
2. Las muestras fueron homogeneizadas por agitación con vortex durante 1 minuto.
3. Luego se realizó una incubación en baño seco a 60 °C durante 1 hora.
4. Posterior a la incubación, se inactivó la enzima por adición de 100  $\mu$ L de alcohol isopropílico absoluto.
5. La fase acuosa se transfirió a un tubo de reacción de 2 mL conteniendo la columna de extracción seguida de una centrifugación por 1 minuto a 8.000 revoluciones por minuto (rpm).
6. Posteriormente, se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 2 mL.

7. Se adicionó 500  $\mu$ L de buffer de lavado 1, previamente suplementado con 80 mL de alcohol etílico absoluto.
8. Se llevó a centrifuga a 8.000 rpm durante 1 minuto.
9. Se descartó el alcohol precipitado y se agregó 500  $\mu$ L de buffer de lavado 2, previamente suplementado 30 mL de alcohol etílico absoluto.
10. Se llevó a centrifuga a 8.000 rpm durante 1 minuto.
11. Se descartó el alcohol precipitado y se centrifugó la columna a 1.2000 rpm durante 1 minuto, para eliminar restos de alcohol que puedan inhibir la enzima Gotaq polimerasa de la PCR.
12. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 1,5 mL y se adicionó 200  $\mu$ L del buffer de elución.
13. Se dejó reposar la columna por 2 minutos a temperatura ambiente.
14. Se llevó a centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm.
15. Se descartó la columna y se almacenó el extracto de ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **1.4 Detección de HPV e identificación de genotipos**

### **1.4.1 Protocolo de PCR- HPV**

Para la detección de HPV se utilizó una PCR (*del inglés Polymerase Chain Reaction*) de punto final dirigida a un segmento de la región L1 del genoma viral, común a todos los HPV mucosotrópicos. Se usaron los cebadores o *primers* degenerados MY11/MY09 (Manos 1989), optimizados previamente en el laboratorio (Venezuela et al. 2013) que permiten amplificar un segmento de aproximadamente 450 pb (Tabla 1). La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de cada *primer*, 200  $\mu$ M de cada desoxinucleótido (dNTPs) (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 10  $\mu$ L de ADN en un volumen final de 50  $\mu$ L. La etapa de amplificación conto una desnaturalización inicial de 3 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguida de 35 ciclos que incluyeron una desnaturalización de 1 minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , hibridación 1 minuto a  $55^{\circ}\text{C}$ , elongación 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$  y una elongación final de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.4.2 Protocolo de RFLP- HPV

Cada uno de los productos positivos de la PCR dirigida a la región L1, fueron utilizados para la determinación del genotipo viral mediante RFLP (*del inglés Restriction Fragment Length Polimorphism*) siguiendo el protocolo de Bernard actualizado según de Villiers (Bernard et al. 1994, de Villiers et al. 2004).

Se utilizaron 7 enzimas de restricción (Promega Corporation, Madison, USA) con las cuales se realizó la digestión del producto de PCR.

- BamHI (*Bacillus amyloliquefaciens*)
- DdeI (*Desulfovibrio desulfuricans*)
- HaeIII (*Haemophilus aegyptius*)
- HinfI (*Haemophilus influenzae*)
- PstI (*Providencia stuartii*),
- RsaI (*Rhodopseudomonas sphaeroides*)
- Sau3AI (*Staphilococcus aureus*)

Se utilizaron 7 tubos estériles de 0,5 mL, uno por cada enzima, que contenía 1,5 µL de enzima, 2 µL de su respectivo buffer, 10µL de agua estéril y 6,5 µL de producto de PCR. Se incubaron luego por el transcurso de 60 minutos a 40°C. La reacción fue revelada por electroforesis en gel de agarosa 2 %, durante 60 minutos. Los patrones de bandas obtenidos con las enzimas de restricción fueron analizados según de Villiers (de Villiers et al. 2004).

#### 1.5 PCR en tiempo real dirigida a los genes E6 y E7 de HPV16

Para la cuantificación de la carga viral en las muestras de los pacientes estudiados, fueron elegidos aquellos que habían resultado HPV genotipo 16, por tratarse del genotipo de alto riesgo más prevalente, tanto en este estudio como a nivel mundial. En estas muestras se realizó la cuantificación de los genes E6 y E7 en reacciones separadas. Se utilizaron *primers* y sondas específicas para cada uno de los genes (Peitsaro et al. 2002, Roberts et al. 2011, Huang et al. 2014) (Tabla 1).

Para la cuantificación del gen E6, la mezcla de reacción consistió en 12,5 µL de Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5 µL de ROX Reference Dye (Invitrogen) en dilución 1:8 y 1 µL de Prime time Std qPCR assay (*primers* y sondas específicas para E6

HPV 16 en una concentración de 300 y 200 nM, respectivamente) en un volumen final de 25 µL. El ciclado de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

Para la cuantificación del gen E7, la mezcla de reacción consistió en 12,5 µL de Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5 µL de ROX Reference Dye (Invitrogen) en dilución 1:8 y 0,5 µL de cada *primer* y sondas específicas para E7 HPV16 en una concentración de 10 y 5 µM, respectivamente en un volumen final de 25 µL. El ciclado de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguida de 60 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

La curva de calibración se realizó utilizando diluciones seriadas de una concentración conocida de ADN de células CaSki. En todas las reacciones se utilizó el equipo StepOne Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific).

### **1.6 PCR para amplificación del gen E6 de HPV16**

Se optimizaron las condiciones para una PCR de punto final (Baez et al. 2004) con *primers* que permiten amplificar un segmento del gen E6 del genoma viral, obteniéndose un amplicón de aproximadamente 523 pb (Tabla 1). La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 5 µL de ADN en un volumen final de 50 µL. La etapa de amplificación conto una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos que incluyeron una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 56°C, elongación 1,30 minutos a 72°C y una elongación final de 10 minutos a 72°C.

### **1.7 PCR para amplificación del gen LCR de HPV16**

Se optimizaron las condiciones para una PCR de punto final (Yamada et al. 1995) con *primers* que permiten amplificar un segmento del gen no codificante LCR del genoma viral, de aproximadamente 530 pb (Tabla 1). La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 5 µL de ADN en un volumen final de

50  $\mu$ L. La etapa de amplificación contó con una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos que incluyeron una desnaturalización de 1 minuto a 95°C, hibridación 1 minuto a 55°C, elongación 1,30 minutos a 72°C y una elongación final de 5 minutos a 72°C.

### **1.8 Secuenciación y análisis de mutaciones puntuales de los genes E6 y LCR de HPV16**

Los productos de las PCR de tamaño esperado fueron extraídos del gel de agarosa y purificados a partir de la banda, utilizando el equipo comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente el ADN (4  $\mu$ L) purificado fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Biodynamics) que permite establecer la cantidad (ng/ $\mu$ L) aproximada de ADN presente en la muestra pre-secuenciación.

El ADN purificado (150 ng/ $\mu$ L) fue sometido a la reacción de secuenciación en ambas direcciones utilizando los *primers* de las respectivas PCR (Macrogen, Inc. Seúl, Corea).

Una vez obtenida las secuencias de los fragmentos amplificados las mismas fueron editadas utilizando el programa ClustalX (Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Irlanda). Posteriormente las secuencias consenso obtenidas se compararon mediante BLASTn 2.2.19 -Basic Local Alignment Search Tool- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra la secuencia completa de referencia de HPV16 obtenidos del banco de datos GenBank (N° de acceso: K02718) (Seedorf et al. 1985). Mediante el programa MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013) se realizó el alineamiento de todas las secuencias y el análisis de la presencia de las mutaciones puntuales.

### **1.9 PCR para amplificación de plásmido críptico de *C. trachomatis***

Se realizó la amplificación de un segmento del plásmido críptico de *C. trachomatis*, de aproximadamente 201 pb, (Lan et al. 1993) optimizado previamente en el laboratorio para estudios epidemiológicos moleculares de esta infección bacteriana en diferentes poblaciones (Kiguen et al. 2019). **Tabla 1.** La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de

cada *primer*, 200  $\mu$ M de dNTPs, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 5  $\mu$ L de ADN en un volumen final de 25  $\mu$ L. La etapa de amplificación conto una desnaturalización inicial de 4 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos que incluyeron una desnaturalización de 1 minuto a 95°C, hibridación 1 minuto a 55°C, elongación 1,30 minutos a 72°C y una elongación final de 4 minutos a 72°C.

## **1.10 Detección de HSV e identificación del tipo viral**

### **1.10.1 Protocolo de PCR- HSV1 y 2**

Se optimizaron las condiciones de una PCR de punto final (Black and Eberle 1997) con *primers* que permiten amplificar un segmento de la región D2 del gen gB, conservada en los  $\alpha$ - herpesvirus. Las bandas de interés tienen un tamaño de aproximadamente 555 pb para HSV1 y 561 pb para HSV2 (Tabla 1). La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de cada *primer*, 200  $\mu$ M de cada dNTPs, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 5  $\mu$ L de ADN en un volumen final de 50  $\mu$ L. La etapa de amplificación conto una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos que incluyeron una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, hibridación 1 minuto a 52°C, elongación 2 minutos a 72°C y una elongación final de 4 minutos a 72°C.

### **1.10.2 Protocolo de RFLP- HSV1 y 2**

Cada uno de los productos positivos para HSV, fueron utilizados para la identificación de HSV1 y HSV2, siguiendo el protocolo de Black (Black and Eberle 1997). Se utilizó una enzima de restricción con las cual se realizó la digestión del producto de PCR: HaeIII (*Haemophilus aegyptius*).

Se incubó 6,5  $\mu$ L del producto de PCR con 1,5  $\mu$ L de enzima, 2  $\mu$ L de su respectivo buffer y 10 $\mu$ L de agua estéril, por el transcurso de 60 minutos a 40°C. La reacción fue revelada por electroforesis en gel de agarosa 2 %, durante 60 minutos. Los patrones de bandas obtenidos con la enzima de restricción fueron analizados según Black (Black and Eberle 1997).

### 1.11 Visualización de los productos de PCR

La detección de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % conteniendo 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de colorante intercalante ECO-Gel 20.000X Highway. Para la determinación del peso molecular de los amplicones detectados se utilizó un marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Biodynamics), donde cada banda de los fragmentos de ADN corresponde a 100 pb y en incremento de 100 pb hasta 1100 pb. La banda más nítida se corresponde al fragmento de 500 pb que posee una triple masa de ADN. La visualización de los productos amplificados se examinó mediante el uso de un transiluminador ultra-violeta (UVP BioDoc-It® Imaging Systems).

## 2. Estudios *in vitro*

### 2.1 Líneas celulares

Para los experimentos se utilizaron tres líneas celulares que fueron establecidas en el laboratorio según recomendaciones del ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*)

- Línea celular **HeLa**: células epiteliales de adenocarcinoma cervical. Contienen integrado el genoma de HPV18. Medio de mantenimiento: MEM (del inglés *Minimum Essential Medium*).
- Línea celular **CaSki**: células epiteliales de carcinoma epidermoide de tejido cervical. Contienen integrado el genoma de HPV16. Medio de mantenimiento: RPMI (del inglés: *Roswell Park Memorial Institute*).
- Línea celular **C33A**: células epiteliales de carcinoma cervical. Negativas para HPV. Medio de mantenimiento: MEM.

#### 2.1.1 Conservación y mantenimiento (sub cultivos) de las líneas celulares

Los cultivos se realizaron a partir de monocapas de cada una de las líneas celulares con una cobertura del 90 %. Con el objeto de desprender la monocapa de la superficie de la botella de cultivo y así amplificar las células, se descartó el medio de cultivo y se lavó tres

veces con tampón fosfato salino: PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), se agregó una solución 0,5% Tripsina- EDTA hasta cubrir la monocapa celular, dejándose en contacto con la misma durante 3-5 minutos a 37°C. Una vez completado el desprendimiento de la monocapa celular, se agregó el medio de cultivo correspondiente, suplementado con 10 % de suero fetal bovino- SFB (Natocor) para inactivar la acción de la enzima y resuspender las células, luego se sembró en botellas o placas según el diseño de los experimentos. Los cultivos se incubaron en estufa gaseada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante un periodo necesario para formar monocapas con la confluencia adecuada para cada experimento.

## **2.2 Generación de línea celular transfectada de forma estable con los genes E6/E7 de HPV16**

### **2.2.1 Transfección de plásmido pLXSN16E6E7 en línea celular C33A**

La línea celular C33A negativa para HPV, fue transfectada con el vector retroviral pLXSN que contenía los ORFs E6 / E7 de HPV16 (pLXSNE6E7), un plásmido que contiene una porción de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 (770 pb). El plásmido fue cedido generosamente por el Dr. Francisco Aguayo de la Universidad de Chile (Addgene plasmid #52394; <http://n2t.net/addgene:52394> ; RRID:Addgene\_52394).

#### **2.2.1.1 Preparación de *Escherichia coli* competentes**

Para amplificar los plásmidos fueron utilizadas bacterias *Escherichia Coli* (*E. coli*). Previamente, fueron preparadas las bacterias competentes usando el método de Cloruro de Calcio. Un inóculo de bacterias conservadas a -80°C fueron incubadas en 5 mL de medio LB (medio Luria-Bertani) sin antibióticos durante 12 a 16 horas a 37°C con agitación. Luego de 12 horas de cultivo se tomaron 2 mL del cultivo y se añadió a 200 mL de medio LB. El cultivo fue dejado en agitación vigorosa durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se transfirieron las bacterias a tubos de centrifuga enfriados con hielo a 0°C y fueron centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 20 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1M + 15 % de glicerol y se incubó en hielo durante 5 minutos. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 1.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Este paso se repitió una vez más. Para permitir que drene el exceso de medio los tubos fueron

colocados en posición invertida durante 1 minuto. Finalmente se agregaron 4 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1M + 15% de glicerol, se mezcló la suspensión bacteriana y se alicuotó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión en tubos Eppendorf. Las alícuotas de bacterias competentes fueron guardadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Para la transformación de bacterias competentes, se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  de las bacterias competentes preparadas como se indicó en el párrafo anterior. Se agregó 1-10 ng de ADN plasmídico y se incubó durante 15 minutos en hielo. Luego fueron incubadas a  $42^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, y nuevamente en hielo por 15 min. Posteriormente, las bacterias fueron crecidas en 1 mL de LB durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Luego fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto, y el pellet fue resuspendido en 250  $\mu\text{L}$  de medio LB sin antibiótico. Por último, se sembró el 25  $\mu\text{L}$  de la resuspensión bacteriana en una placa con LB-agar con Ampicilina y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  en estufa para bacterias por 16 hs.

#### **2.2.1.2 Protocolo de extracción y purificación de ADN plasmídico**

Para la extracción y purificación de los plásmidos se utilizó un Kit miniprep de Imbio Highway. El primer paso fue inocular 10 mL de medio LB (con ampicilina) con una colonia bacteriana y se cultivó durante 12 a 16 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. Se tomó 1,5 mL de cada cultivo y se centrifugó 1 a 2 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante fue eliminado. Posteriormente se homogeneizó el pellet en buffer de resuspensión conteniendo ARNasa. Se agregó buffer de lisis y la suspensión fue incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó buffer de neutralización y se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm. Se agregó el sobrenadante en una mini columna, y se centrifugó 1 minuto a 12000 rpm. Se realizaron 2 lavados con el buffer de lavado, provistos por el kit de purificación, centrifugando como en el paso anterior para descartar la solución.

Posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 12.000 rpm para eliminar restos del buffer y se colocó la columna en un microtubo Eppendorf. Se agregó buffer de elución (pH: 8.0) y se incubó 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó 2 minutos a 12.000 rpm para que el ADN plasmídico eluya en el microtubo y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ .

Luego de la extracción, se cuantificó el ADN plasmídico utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Para ello se utilizó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido extraído y se midió la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda 280 nm, 260 nm y 230 nm, obteniéndose una concentración de 109 ng/ $\mu\text{L}$  ( $260/280= 1,89$ - $260/230= 2,12$ ). De acuerdo a la relación de las longitudes de onda 260/280 nm, se observó que el plásmido era relativamente puro y con bajo contenido de proteína; de acuerdo a los valores de la relación 260/230 puede observarse que la presencia de ARN en la muestra, es despreciable. Estos resultados muestran que el plásmido tiene una pureza y una concentración apropiada para realizar transfecciones.

### 2.2.1.3 Protocolo de transfección estable

Los ensayos de transfección se realizaron utilizando NaCl y PEI. El PEI es un polímero sintético estable con un nitrógeno amino cada 3 átomos que pueden protonarse confiriéndole a la molécula elevado potencial de carga catiónica. El PEI atrapa el ADN cargado negativamente y estos complejos se unen a la superficie de la célula. La absorción del ADN ocurre a través de vesículas endosomales, que luego liberan el plásmido al citoplasma. El PEI es un vector altamente eficiente para la liberación intracelular de oligonucleótidos y plásmidos tanto *in vitro* como *in vivo* (Boussif et al. 1995).

Se preparó una placa de cultivo de seis pocillos con células C33A, utilizando 3 mL de medio MEM basal sin antibióticos. Se mezclaron 2,5  $\mu\text{g}$  del plásmido recombinantes pLXSN con 125  $\mu\text{L}$  de NaCl y 3  $\mu\text{L}$  de PEI, lo cual se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió directamente a la placa de células que contenían MEM suplementado con SFB al 5% sin antibióticos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y luego se descartó el medio de cultivo celular el cual fue reemplazado por MEM suplementado con SFB al 5% y 50 mg/mL de antibiótico G418 para la selección. Después de 2 a 3 semanas, se realizó el control de transfección mediante PCR dirigida al gen E6-HPV16. (Tabla 1).

Esta nueva línea celular transfectada será nombrada de aquí en adelante: **C33AE6E7** (con el fin de simplificar el nombre). Las condiciones de conservación y mantenimiento son las mismas que se utilizan para la línea celular C33A.

### **2.3 Titulación de *Chlamydia trachomatis* por identificación en cultivos celulares de las unidades formadoras de inclusión**

Se utilizó un stock bacteriano de *C. trachomatis* de la cepa L2/434/Bu perteneciente al serovar Linfogramuloma Venéreo L2 (LGV2). Se prepararon botellas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> con monocapa de células al 80% de confluencia para cada una de las líneas celulares. Luego fueron inoculadas con 100 µL del stock de cepa patrón (previamente centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm).

A las 24/48 h., cuando se observaron inclusiones clamidiales al microscopio óptico, se obtuvieron los inóculos por disrupción mecánica utilizando perlas de vidrio y vortex. Estos nuevos inóculos en cada línea celular fueron conservados a -80°C hasta su posterior cuantificación.

La titulación fue realizada por el método de unidades formadoras de inclusión (UFI) bajo medio líquido y la concentración bacteriana fue expresada como número de UFI por mililitro (UFI/mL). En una placa de 24 pocillos (una para cada línea celular) se sembró 500µl de células en cada uno. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se colocó 100µl del inóculo obtenido anteriormente; se mantuvo durante 2 horas en estufa a 37°C, luego de ese tiempo se retiró el inóculo y se completó cada pocillo con 500 µL de medio de cultivo. Se utilizaron diluciones seriadas del inóculo (por duplicado).

A las 24/48 hs, cuando se observaron inclusiones, se fijó cada pocillo con metanol frío (200 µL) durante 20 minutos. Luego se realizó la coloración de Hoechst 1X durante 5 minutos y se lavó el excedente con PBS. Cada una de las diluciones se visualizó en microscopio de fluorescencia invertido, obteniéndose un promedio de cada duplicado de las diluciones.

Se obtuvo la concentración del inóculo según la siguiente fórmula (Merrit et al. 2005):

$$\text{UFI/mL} = \frac{\text{promedio de inclusiones por campo} \times \text{Factor de dilución} \times \text{n}^{\circ} \text{ de campos/pocillo}}{\text{Volumen de inóculo}}$$

### **2.4 Titulación de Virus Herpes Simple 1 por ensayo de placa**

La cepa KOS HSV1 fue propagada en monocapa de células Vero76; línea celular derivada de células epiteliales renales de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

Monocapas de células Vero clon 76, en un 90 % de confluencia crecida en placas de 12 pocillos, fueron infectadas con 100  $\mu\text{l}$  de diluciones logarítmicas desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-8}$  del inóculo viral durante 1 hora a 37 °C con agitaciones periódicas cada 15 min para permitir la adhesión y penetración de las partículas virales en las células. Luego, con el fin de impedir la libre difusión de los nuevos viriones se agregó en cada pocillo 1 mL de una solución de agarosa fundida al 1 % en agua y DMEN (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) 2X al 8% de SFB en una relación 1:1, con una temperatura de  $\approx 45$  °C. Una vez solidificada la solución de agarosa/DMEN, las placas se incubaron en estufa gaseada (5 % de CO<sub>2</sub>) a 37°C. El recuento de la formación de placas se realizó a las 48 horas post- infección (hpi), utilizando una tinción con cristal violeta por 5 minutos, previa fijación de los cultivos con formol al 10 % durante 2 horas. Esta técnica se basa en que una placa aislada de lisis (área de la monocapa sin células ó células muertas) es originada a partir de una partícula viral infectante, denominándose unidad formadora de placa (UFP). El título viral se expresa por el número de UFP por unidad de volumen del inóculo (UFP/mL).

### 2.5 Protocolo de infección por *C. trachomatis* y HSV1

Se prepararon 8 botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de cada línea celular, que fueron utilizadas para obtener inóculos a dos tiempos: 24 horas pos infección (hpi) y 48 hpi; en mono infección (*C. trachomatis* y HSV1 por separado) y co- infección de ambos microorganismos juntos.

Se realizó la infección de las monocapas celulares con el mismo protocolo descrito para la titulación de cada uno de los microorganismos, obteniéndose así un total de 8 inóculos por cada línea celular:

- 1- Células sin infectar con *C. trachomatis* y/o HSV1, obtenidas a las 24 horas pos cultivo.
- 2- Células infectadas con *C. trachomatis* 24 hpi.
- 3- Células infectadas con HSV1 24 hpi.
- 4- Células infectadas simultáneamente con *C. trachomatis* y HSV1 24 hpi.

5- Células sin infectar con *C. trachomatis* y/o HSV1 obtenidas a las 48 horas pos cultivo.

6- Células infectadas con *C. trachomatis* 48 hpi.

7- Células infectadas con HSV1 48 hpi.

8- Células infectadas simultáneamente con *C. trachomatis* y HSV1 48 hpi.

Transcurrido el tiempo correspondiente en cada una de las infecciones, las mismas fueron obtenidas por interrupción mecánica utilizando perlas de vidrio y vortex. Los inóculos fueron luego conservados a -80°C para su posterior análisis.

## **2.6 Determinación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 y 18**

### **2.6.1 Protocolo de extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial de extracción ilustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare- UK) de acuerdo al protocolo del fabricante.

1. *Lisis celular.* A cada tubo de reacción de 1,5 mL que contenía 200 µL del inóculo, se le adicionó 350 µL de buffer RA1 y 3,5 µL de β-mercaptoetanol.
2. Las muestras fueron homogeneizadas por agitación con vortex durante 1 minuto.
3. *Filtrado del lisado celular:* Se transfirió la mezcla a un tubo de reacción de 2 mL conteniendo una columna de extracción y se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm.
4. *Ajuste de las condiciones de unión del ARN:* Se descartó la columna y se agregó 350 µL de etanol 70%.
5. Se transfirió luego la mezcla a un tubo de reacción de 2 mL conteniendo una nueva columna de extracción, y se centrifugó por 30 segundos a 8.000 rpm.
6. *Desalinizado de la membrana de sílice:* Se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 2 mL.

7. Se adicionó 350  $\mu\text{L}$  de buffer MDB (*Membrane Desalting Buffer*) y se centrifugó por un minuto a 8.000 rpm. Se descartó la fase acuosa y se colocó nuevamente la columna en el tubo.
8. *Digestión del ADN*: En un tubo estéril se preparó una mezcla de 90  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción DNasa y 10  $\mu\text{L}$  de DNasa I. Se agregó 95  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en cada columna y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. *Lavado y secado de la membrana de sílice*: Se realizó un primer lavado aplicando 200  $\mu\text{L}$  de buffer RA2 (el cual tiene como función inactivar la DNasa I) que luego se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm. Se descartó la fase acuosa y se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 mL.
10. En un segundo lavado se utilizó 600  $\mu\text{L}$  de buffer RA3 previamente suplementado con etanol 96%. Se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm. Se descartó la fase acuosa y se colocó la columna nuevamente en el mismo tubo.
11. En un tercer lavado se utilizó 250  $\mu\text{L}$  de buffer RA3 el cual se centrifugó durante 2 minutos a 8.000 rpm.
12. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1,5 mL.
13. *Elución de ARN*: Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm.
14. Se descartó la columna y se almacenó el extracto de ARN a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 2.6.2 Retrotranscripción: ARN a ADN complementario (ADNc)

Se utilizaron hexámeros de *random primers* (Biodynamics) que permiten transcribir todo aquel ARN extraído de la muestra a ADNc. La mezcla de reacción consistió en 10 pmol de *random primers*, 10 mM de cada dNTPs, 25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de enzima ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Promega), 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima Recombinant RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor (Promega) y 10  $\mu\text{L}$  de ARN en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

Se incubo previamente 10  $\mu\text{L}$  del ARN extraído a 65°C por 10 minutos, luego se agregó la mezcla de reacción seguida de un ciclo a 42°C por 60 minutos. El ADNc obtenido fue conservado a -20°C hasta su utilización.

### 2.6.3 qPCR dirigida a los genes E6 y E7 de HPV16 y HPV18

A partir del ADNc obtenido de cada uno de los modelos de infección anteriormente descritos, se realizó la cuantificación relativa, de la expresión de los genes E6 y E7 utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  en aquellas líneas que contenían HPV (HeLa, CaSki y C33A-E6E7), en reacciones separadas.

Se utilizaron *primers* y sondas específicas (Peitsaro et al. 2002, Roberts et al. 2011, Huang et al. 2014) (Tabla 1), en una reacción que consistió en 3  $\mu\text{L}$  de ADNc equivalente a una concentración de 100 ng, para lo cual previamente se realizó la cuantificación del ADNc obtenido de la retrotranscripción, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

Se utilizó el gen GAPDH humano como control interno celular para la normalización de la reacción (Nolan et al. 2006) (Tabla 1)

Para la cuantificación de la expresión del gen E6, la mezcla de reacción consistió en 12,5  $\mu\text{L}$  de Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de ROX Reference Dye (Invitrogen) en dilución 1:8, 1  $\mu\text{L}$  de Prime time Std qPCR assay (*primers* y sondas específicas para E6 HPV 16 o 18 en una concentración de 300 y 200 nM, respectivamente) y 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* y sonda del gen GAPDH (en una concentración de 300 y 100 nM, respectivamente), en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . El ciclado de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

Para la cuantificación de la expresión del gen E7, la mezcla de reacción consistió en 12,5  $\mu\text{L}$  de Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de ROX Reference Dye (Invitrogen) en dilución 1:8, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* y sondas específicas para E7 HPV 16 o 18 en una concentración de 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente y 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* y sonda del gen GAPDH (en una concentración de 300 y 100 nM, respectivamente), en un volumen

final de 25  $\mu$ l. El ciclado de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguida de 60 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

En ambas reacciones se utilizó el equipo StepOne Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific). Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.01.

## **2.7 Estudio de la localización e intensidad de fluorescencia de la proteína p53 por inmunofluorescencia indirecta**

Las monocapas de células fueron cultivadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm a un 80 % de confluencia. Se realizó la infección de las células con *C. trachomatis*, con HSV1 y con ambos inóculos en simultáneo, a dos tiempos diferentes (24 y 48 hpi) para cada una de las líneas celulares. Transcurrido el tiempo correspondiente se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v)-120mM de sacarosa en PBS, pH 7.3 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fijadas se lavaron con PBS a temperatura ambiente, y se permeabilizaron con una solución de 0.2% Tritón-X100 en PBS durante 5 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente, los sitios inespecíficos se bloquearon por una hora a temperatura ambiente con albúmina sérica bovina (BSA) Sigma, al 5% en PBS. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario, (diluidos en BSA al 1% en PBS), toda la noche a 4°C. Por último, cada uno de los cubreobjetos fue lavado 3 veces por 5 minutos con PBS e incubados por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Después de ser lavados 3 veces por 5 minutos con PBS, se realizó una tinción de Hoechst 1X durante 5 minutos. Luego se realizaron nuevos lavados con PBS y finalmente los discos se montaron en portaobjetos utilizando FluorSave™ Reagent (Calbiochem) como medio de montaje.

Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anticuerpo primario: Purified Mouse Anti- Human p53 (Clon DO-7) BD Pharmingen (1:1.000) el cual reconoce p53 salvaje y mutado; y anticuerpo secundario: Anti- Mouse IgG (whole molecule)- FITC, Sigma (1:500).

Una vez secado el medio de montaje utilizado, la inmunofluorescencia es visualizada en un microscopio invertido (Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81. Imaging Software: Cell M) equipado con epifluorescencia y contraste de interferencia

diferencial (DIC) usando objetivos de UPLSAPO40X, UPLSAPO60XO o UPLSAPO100XO. Las imágenes fluorescentes fueron tomadas bajo microscopía de fluorescencia regular con una cámara CCD de alta resolución monocromo (ORCA-285, Hamamatsu Corp., Middlesex, NJ). Las imágenes fueron analizadas digitalmente a través del programa FIJI.

## 2.8 Estudio de apoptosis por tinción de TUNEL

Las monocapas de células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a un 80 % de confluencia. Se realizó la infección de las células con *C. trachomatis*, con HSV1 y con ambos inóculos en simultáneo, a dos tiempos diferentes (24 y 48 hpi) para cada una de las líneas celulares. Como control positivo de apoptosis se utilizó el fármaco Doxorubicina 3448,4  $\mu\text{M}$ . El marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL por sus siglas en inglés) es un método para detectar fragmentación de ADN marcando el fragmento terminal de los ácidos nucleicos. La droga inductora de apoptosis “doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. Se utiliza para el tratamiento de cánceres humanos que incluyen diferentes cánceres sólidos. Muestra una variedad de mecanismos moleculares a nivel celular que explican su papel como intercalante entre dos bases nitrogenadas de doble hélice de ADN, generación de radicales libres que conducen a la ruptura de cadenas de ADN, inhibición de las enzimas de la cadena respiratoria en las mitocondrias, oxidación de lípidos de membrana, interferencia con desenrollamiento de ADN y actividad de helicasa, e inducción de apoptosis en respuesta a la inhibición de topoisomerasa II (Mizutani et al. 2005, Pilco-Ferreto and Calaf 2016).

Transcurrido el tiempo de infección correspondiente, se fijaron las monocapas con metanol frío durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS, luego se colocó el reactivo de TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit, TMR red. Roche) en una relación 1:10 (enzyme solution: label solution) durante 1 hora a 37° C protegido de la luz. Se procedió al lavado con PBS 3 veces y luego se colocó colorante Hoechst 33258, Pentahydrate- bis-Benzimide (Thermo Fisher Scientific) 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dicho colorante con PBS 3 veces y se observó al microscopio de fluorescencia descripto anteriormente.

## **2.9 Análisis estadístico**

Las asociaciones entre las variables cualitativas se analizaron utilizando la Prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o Prueba de Fisher; mientras que para valorar diferencias entre promedios de niveles de expresión se utilizó la prueba t de Student. Además, se estimó la fuerza de asociación mediante OR (odd ratio) y su respectivo intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Para todas las pruebas se fijó un nivel de significación del 5%. Los datos se analizaron con el software Epi info 3.5.4, CDC software (2012).

**Tabla1.** *Primers* y sondas utilizadas en las diferentes PCR.

	Gen blanco	Secuencia <i>primers</i> / sondas (5'- 3')	Amplicón
HPV	L1	F: GCMCAGGGWCATAAYAATGG R: CGTCCMARRGGAWACTGATC	450 pb
	E6 HPV16*	F: CGAAACCGGTTAGTATAA R: GTATCTCCATGCATGATT	523 pb
	LCR HPV16*	F: CAACACCTACTAATTGTGTGG R: AAATCGGTTTGCACACACCCATGT	530 pb
	E6 HPV16**	F: GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC R: TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC S: FAM- CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT- DQ	81 pb
	E6 HPV18**	F: AGCTGGGCACTATAGAGGC R: TGTGTTTCTCTGCGTCGTTGG S: FAM- CCATTCGTGCTGCAACCGAGCACGAC-DQ	80 pb
	E7 HPV16**	F: GATGAAATAGATGGTCCAGC R: GCTTTGTACGCACAACCGAAGC S: FAM- CGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCT- BHQ	107 pb
	E7 HPV18**	F: AAGAAAACGATGAAATAGATGGA R: GGCTTCACACTTACAACACA S: FAM- CCCGACGAGCCGAACCACAACGTCACACAA- -BHQ	103 pb
Control Endógeno	GAPDH**	F: GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC R: CATGAGTCCTTCCACGATAACC S: FAM- CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG- BQH	122 pb
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido	F: TAGTAACTGCCACTTCATCA R: TTCCCCTTGTAATTCGTTGC	201 pb
HSV	D2	F: TTY ACC GTG GSC TGG GAC TGG R: GYG RTT CTG SAG CTC GCA CCA	HSV1: 555 pb HSV2: 561 pb

**F:** *primer* forward- **R:** *primer* reverse- **S:** sonda

\* estudio de mutaciones puntuales

\*\* qPCR

# *Capítulo IV*

---

Resultados

---

## RESULTADOS

### 1. Estudios en pacientes

#### 1.1 Detección de patógenos de transmisión sexual: HPV, *C. trachomatis* y HSV, en lesiones orales

Se estudiaron un total de 318 muestras de pacientes, 169 de sexo femenino y 149 de sexo masculino. La edad de los mismos estuvo comprendida entre 20 y 88 años. El estudio de anatomía patológica determinó que 137 (43%) de las muestras analizadas pertenecían a lesiones benignas (B) como condilomas y verrugas vulgares, 96 (30%) a desórdenes potencialmente malignos (PMOD), incluyendo líquenes planos, erosivos y verrugosos y leucoplasia verrugosa, y 85 (27%) carcinomas orales de células escamosas (OSCC).

Se obtuvo una prevalencia del 34,3% (109/318) de HPV positivos (Tabla 2). Del total de muestras positivas, se logró genotipificar el 66,9% (73/109). Los genotipos identificados fueron de bajo riesgo (BR): 6, 11, 13, 40 y 84, presentes tanto en mono infección como también en co- infección con dos genotipos de BR, en el 63,0% de los casos (46/73) y genotipos de alto riesgo (AR) como el 16, 31, 33 y 53, incluyendo también co- infecciones con dos genotipos de AR, en el 31,5% (23/73). A su vez se detectaron co- infecciones con genotipos de BR y AR en el 5,5% de las muestras analizadas (4/73) (Tabla 3). Cabe destacar que no fue posible obtener el genotipo de todas las muestras que habían resultado HPV positivas, debido a que las enzimas no logran resolver los patrones de restricción de manera clara. Esto puede deberse a que la muestra analizada no cuente con suficiente cantidad de ADN viral para que dicho proceso enzimático se realice correctamente. Como resultado se obtuvieron 36 muestras positivas para HPV, sin determinación de genotipo.

De acuerdo con el tipo de la lesión, la frecuencia de detección de genotipos de AR aumentó en relación a la severidad de la lesión. Cabe destacar que aquellos casos de co- infecciones con un genotipo de BR y uno de AR, se agruparon entre los de AR, por ser éstos últimos clínicamente más relevantes (Figura 3). Los genotipos más frecuentemente detectados fueron 6 (BR) en 29 muestras y el 16 (AR) en 16 muestras. Es importante

señalar que, si bien el genotipo 53 se clasifica actualmente como de riesgo intermedio, a los fines de simplificar el análisis del presente estudio, el mismo fue incluido en el grupo de los genotipos de alto riesgo, ya que fue detectado en PMOD y en OSCC y en co- infecciones con el genotipo 16 (Figura 3).

La prevalencia de *C. trachomatis* fue de 16,9% (54/318) y la de HSV fue de 3% (10/318) (Tabla 2). HSV 1 y 2 se detectaron en 7 y 3 muestras, respectivamente. De los 10 HSV positivos, 8 muestras fueron de lesión B y 6 de éstas en co- infección con *C. trachomatis* (Tabla 4).

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de HPV y *C. trachomatis* por sexo, edad y tipo de lesión ( $p > 0,05$ ), aunque la presencia de HSV estuvo asociada de manera significativa a todas las variables ( $p = 0,02$ ) (Tabla 2).

En cuanto a la relación con el consumo de tabaco y alcohol, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre estos factores de riesgo y los agentes patógenos estudiados. Del total de pacientes incluidos en este estudio, solo en 85 (27%) de ellos se registró la ingesta de alcohol y consumo de tabaco. Los datos recopilados mostraron que 42 (13%) pacientes manifestaron el uso de tabaco; en relación a la ingesta de alcohol, 34 (11%) pacientes respondieron de manera afirmativa ante la consulta de si consumían alcohol.

La co- infección más frecuentemente detectada fue HPV- *C. trachomatis* (4%), seguida de *C. trachomatis*-HSV (1.8%) y en la mayoría de las co- infecciones el genotipo de HPV detectado fue de BR (Tabla 5). Una única paciente presentó triple infección en una lesión B con genotipos de HPV de BR y HSV tipo 2.

Los resultados se encuentran publicados, *J Oral Microbiol* (2019) (Anexo III).

**Tabla 2.** Porcentaje de detección de cada uno de los microorganismos estudiados según sexo y tipo de lesión.

		Total N=318 (100%)		HPV positivo n=109 (34%)					<i>C. trachomatis</i> positivo n=54 (17%)					HSV positivo n=10 (3%)				
		n	(%)	n	(%)	p valor	OR	IC (95%)	n	(%)	p valor	OR	IC (95%)	n	(%)	p valor	OR	IC (95%)
<b>Sexo</b>	<b>Masc.</b>	149	46,9	50	45,9	0,89	1,06	(0,66- 1,68)	27	50	0,71	0,85	(0,47- 1,54)	1	10	0,02	1,73	(1,37- 2,18)
	<b>Fem.</b>	169	53,1	59	54,1				27	50				9	90			
<b>Lesión</b>	<b>B</b>	137	43,1	39	35,8	0,07	1,58	(0,98- 2,55)	27	50	0,32	0,71	(0,39- 1,28)	8	80	0,02	0,34	(0,09- 1,19)
	<b>PMOD</b>	96	30,2	34	31,2				18	33,3				1	10			
	<b>OSCC</b>	85	26,7	36	33				9	16,7				1	10			

**B:** lesión benigna, **PMOD:** desorden potencialmente maligno; **OSCC:** carcinoma oral de células escamosas.

**Tabla 3.** Características de las muestras HPV positivas genotipificadas (n=73).

Sexo	Lesión	Genotipo	Riesgo	<i>C.trachomatis</i>	HSV
F	B	6	BR	-	-
M	B	6- 11	BR	-	-
M	B	11	BR	-	-
M	B	11	BR	-	-
M	B	6	BR	-	-
M	B	6- 11	BR	+	-
M	B	11	BR	-	-
F	B	11	BR	-	-
M	B	6- 11	BR	-	-
M	B	6	BR	-	-
M	B	40	BR	-	-
F	B	13	BR	+	-
F	B	6	BR	-	-
F	B	6- 13	BR	+	+
F	B	6	BR	+	-
M	B	11	BR	-	-
M	B	6	BR	-	-
F	B	16	AR	-	-
F	B	31	AR	-	-
F	B	31	AR	-	-
F	B	16	AR	-	-
F	B	31	AR	-	-
F	B	16- 11	AR	+	-
M	PMOD	6- 11	BR	-	-
F	PMOD	11	BR	-	-
F	PMOD	6	BR	-	-
M	PMOD	6- 11	BR	-	-
F	PMOD	6	BR	-	-
M	PMOD	6	BR	-	-
F	PMOD	6	BR	-	-
F	PMOD	6	BR	-	-
F	PMOD	84	BR	-	-
M	PMOD	6	BR	-	-
M	PMOD	11	BR	-	-
M	PMOD	11	BR	-	-
F	PMOD	11	BR	+	-
F	PMOD	11	BR	-	-

---

M	PMOD	6	BR	-	-
F	PMOD	84	BR	+	-
F	PMOD	16- 53	AR	-	-
F	PMOD	31	AR	-	-
F	PMOD	53	AR	-	-
F	PMOD	16	AR	-	-
M	PMOD	11- 16	AR	+	-
F	PMOD	16	AR	-	-
F	PMOD	16	AR	-	-
F	PMOD	16	AR	-	-
F	PMOD	31	AR	-	-
F	PMOD	31	AR	-	-
M	OSCC	11	BR	-	-
M	OSCC	11- 6	BR	-	-
M	OSCC	6- 11	BR	-	-
M	OSCC	6	BR	-	-
M	OSCC	11	BR	-	-
M	OSCC	6	BR	+	-
M	OSCC	6	BR	+	-
M	OSCC	11	BR	+	-
M	OSCC	6	BR	-	-
F	OSCC	11	BR	-	-
M	OSCC	6- 11	BR	-	-
F	OSCC	6	BR	-	-
M	OSCC	11- 6	BR	-	-
M	OSCC	16	AR	-	-
M	OSCC	6- 16	AR	-	-
F	OSCC	33	AR	-	-
M	OSCC	16	AR	-	-
F	OSCC	16	AR	-	-
F	OSCC	16	AR	-	-
F	OSCC	16- 53	AR	-	-
M	OSCC	31	AR	-	-
F	OSCC	53	AR	-	-
M	OSCC	16	AR	-	-
F	OSCC	6, 16- 53	AR	-	-

---

**B:** lesión benigna, **PMOD:** desorden potencialmente maligno; **OSCC:** carcinoma oral de células escamosas.  
**AR:** alto riesgo; **BR:** bajo riesgo

**Tabla 4.** Características las muestras HSV positivas (n=10).

Tipo de HSV	Sexo	Lesión	HPV/genotipo/riesgo	<i>C. trachomatis</i>
1	F	B	-	+
1	F	B	-	+
1	F	B	-	-
1	F	B	-	-
1	F	B	-	+
*2	F	B	<b>+/6-13/BR</b>	+
2	F	B	-	-
2	F	B	-	-
1	F	PMOD	-	+
1	M	OSCC	-	+

**B:** lesión benigna, **PMOD:** desorden potencialmente maligno; **OSCC:** carcinoma oral de células escamosas.

**AR:** alto riesgo; **BR:** bajo riesgo

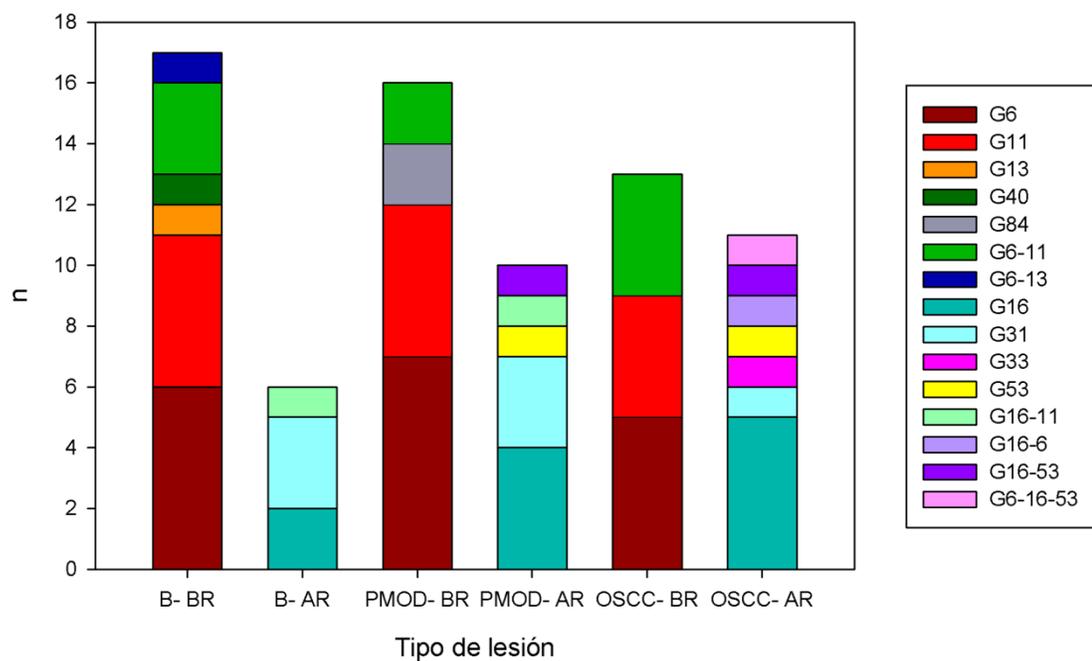
\*Paciente femenina con triple co- infección (HPV, *C. trachomatis* y HSV.)

**Tabla 5.** Porcentaje de co- infecciones detectadas.

		<b>Total</b>		<b>Co- infección HPV-C. <i>trachomatis</i></b>		<b>Co- infección HPV-HSV</b>		<b>Co- infección (C. <i>trachomatis</i>-HSV)</b>	
		<b>N=318 (100%)</b>		<b>n=13 (4%)</b>		<b>n=1 (0,3%)</b>		<b>n=6 (1,8%)</b>	
		<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Sexo</b>	<b>Masc.</b>	149	46,9	6	46,2	0	0	1	16,7
	<b>Fem.</b>	169	53,1	7	53,8	1	100	5	83,3
<b>Lesión</b>	<b>B</b>	137	43,1	6	46,1	1	100	4	66,6
	<b>PMOD</b>	96	30,2	4	30,8	0	0	1	16,7
	<b>OSCC</b>	85	26,7	3	23,1	0	0	1	16,7
<b>Genotipo- riesgo</b>	<b>AR</b>			2	15,4	0	0		
	<b>BR</b>			9	69,2	1	100		
	<b>S/G</b>			2	15,4	0	0		

**B:** lesión benigna, **PMOD:** desorden potencialmente maligno; **OSCC:** carcinoma oral de células escamosas.

**AR:** alto riesgo; **BR:** bajo riesgo; **S/G:** sin genotipificación.



**Figura 3.** Genotipos de HPV según tipo de lesión.

**G:** genotipo.

**B-BR:** lesión benigna- bajo riesgo, **B-AR:** lesión benigna- alto riesgo, **PMOD-BR:** desorden potencialmente maligno- bajo riesgo, **PMOD-AR:** desorden potencialmente maligno- alto riesgo, **OSCC-BR:** carcinoma oral de células escamosas- bajo riesgo, **OSCC-AR:** carcinoma oral de células escamosas- alto riesgo.

## 1.2 Cuantificación de carga viral de oncogenes E6 y E7 de HPV16.

En el presente estudio no se obtuvieron genotipos HPV18, ni en mono infección ni en co- infección con otros genotipos. Por esta razón, la cuantificación se realizó sólo en aquellas muestras de pacientes que resultaron genotipo 16, ya sea en mono infección o en co- infección con otros genotipos.

Sin embargo, fue posible analizar la carga viral de un total de 13 muestras HPV16 positivas. Esta limitación en el número de muestras estudiadas se debió a la escasez de ADN, ya que, debido a las repeticiones de los experimentos, tanto para la confirmación de sus resultados como para la genotipificación, secuenciación y estudio de co- infecciones, se agotó la cantidad de ADN que se había obtenido de la extracción inicial.

Los resultados se muestran en la Tabla 6 y Figura 4. No se vio relación entre la mayor carga viral y el tipo de lesión. Cabe destacar que la mayoría de las muestras que resultaron HPV16 positivas pertenecieron a OSCC y a PMOD. Se obtuvieron sólo dos muestras de lesiones benignas HPV16 positivas; en estas últimas no se vieron diferencias con los otros tipos de lesiones en relación a la carga viral detectada.

Tampoco se observó asociación de la carga viral en referencia al sexo del paciente, a los factores de riesgo convencionales como tabaco y alcohol y a la co- infección con *C. trachomatis*; más aún en aquellas muestras que resultaron *C. trachomatis* positivas se obtuvieron cuantificaciones muy variables entre sí para cada uno de los oncogenes de HPV estudiados.

Estos resultados nos indican que la carga viral de los oncogenes de HPV no depende exclusivamente del tipo de lesión que manifieste el paciente, como así tampoco de la co- infección con *C. trachomatis* y el uso de tabaco y alcohol. En estos pacientes HPV16 positivos no se detectó HSV.

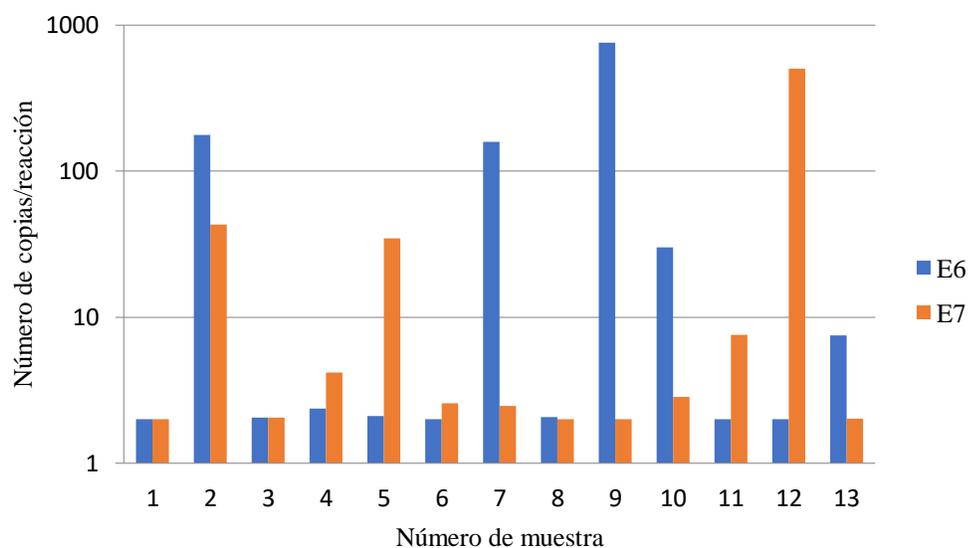
A su vez, se pudo observar un valor de carga viral independiente de E6 y E7, es decir, se expresan en cantidades diferentes en un mismo paciente.

**Tabla 6.** Características de las muestras estudiadas para carga viral de E6 y E7 de HPV16.

N° muestra	Sexo	FRC			Lesión	Genotipo	<i>C. trachomatis</i>	HSV
		Tabaco	Alcohol					
1	F	si	si	B	16	-	-	
2	F	no	no	B	16	+	-	
3	F	no	no	PMOD	16	-	-	
4	M	no	no	PMOD	11, 16	+	-	
5	F	no	no	PMOD	16	-	-	
6	F	si	no	PMOD	16	-	-	
7	F	no	no	PMOD	16	-	-	
8	F	si	no	PMOD	16, 53	-	-	
9	M	si	si	OSCC	6, 16	-	-	
10	F	no	si	OSCC	16	-	-	
11	F	no	no	OSCC	16	-	-	
12	F	no	no	OSCC	16	-	-	
13	M	si	si	OSCC	11, 16	-	-	

**B:** lesión benigna, **PMOD:** desorden potencialmente maligno; **OSCC:** carcinoma oral de células escamosas.

**FRC:** factores de riesgo convencionales.

**Figura 4.** Carga viral de los genes E6 y E7 de HPV16, expresado en copias por reacción.

### **1.3 Estudio de mutaciones puntuales**

Para el análisis de mutaciones de los genes E6 y LCR de HPV16, se enviaron a secuenciar (Macrogen Inc.- Korea) aquellas muestras en las que fue posible amplificar cada uno de estos genes. Las secuencias fueron alineadas y analizadas con el programa Mega 5 para determinar las mutaciones puntuales presentes en cada una de ellas.

#### **1.3.1 Análisis de las secuencias obtenidas de la región E6 de HPV16**

Se obtuvieron un total de 23 secuencias óptimas para el análisis del gen E6 (Tabla 7). En el alineamiento se pudo observar que en 18 de las secuencias estuvo presente la mutación T350G, es decir, mutación puntual en la posición 350 del genoma de HPV, que produce un cambio de la base nucleotídica Timina por Guanina. A su vez, dicha mutación se encontró en el codón 83, produciendo una sustitución aminoacídica de Leucina por Valina (L83V).

Con respecto al tipo de lesiones orales presentes en las muestras secuenciadas para E6, se observaron 14 OSCC (10 mutadas), 4 PMOD (3 mutadas) y 5 lesiones B todas con la mutación presente.

#### **1.3.2 Análisis de las secuencias obtenidas de la región LCR de HPV16**

Del total amplificado para el gen LCR, 7 secuencias fueron óptimas para su análisis genómico. (Tabla 8). La mutación G7521A (cambio de nucleótidos Guanina por Adenina) fue la más frecuentemente detectada en el gen LCR, tal como ocurrió en este análisis, la cual estuvo presente en 6 de 7 secuencias.

Con respecto al tipo de lesiones orales presentes en las muestras secuenciadas para LCR, se observaron 2 OSCC manifestando ambas la mutación descrita, 4 PMOD (3 mutadas) y 1 lesión B la cual también presentó la mutación.

**Tabla 7.** Fragmento de secuencia nucleotídica del gen E6 -HPV16.

N° muestra	Tipo de lesión	E6								
		346	347	348	349	350	351	352	353	354
Referencia	OSCC	T	A	G	T	<b>T</b>	T	G	T	A
2	OSCC	T	A	G	T	T	T	G	T	A
10	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
14	OSCC	T	A	G	T	T	T	G	T	A
17	PMOD	T	A	G	T	T	T	G	T	A
18	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
19	PMOD	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
25	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
27	OSCC	T	A	G	T	T	T	G	T	A
29	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
30	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
52	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
75	PMOD	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
86	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
105	B	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
120	B	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
121	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
123	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
144	OSCC	T	A	G	T	T	T	G	T	A
158	B	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
210	PMOD	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
227	B	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
234	B	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A
235	OSCC	T	A	G	T	<b>G</b>	T	G	T	A

Primera línea: secuencia de referencia de HPV 16, número de acceso a GenBank: K02718. La posición nucleotídica 350 señala las mutaciones puntuales presentes.

**Tabla 8.** Fragmento de secuencia nucleotídica del gen LCR -HPV16.

N° muestra	Tipo de lesión	LCR								
		7517	7518	7519	7520	<b>7521</b>	7522	7523	7524	7525
Referencia	OSCC	C	T	A	T	<b>G</b>	G	T	T	T
11	PMOD	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T
41	OSCC	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T
48	OSCC	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T
116	PMOD	C	T	A	T	<b>G</b>	G	T	T	T
138	B	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T
237	PMOD	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T
297	PMOD	C	T	A	T	<b>A</b>	G	T	T	T

Primera línea: secuencia de referencia de HPV 16, número de acceso a GenBank: K02718. La posición nucleotídica 7521 señala las mutaciones puntuales presentes.

---

## 2. Estudios *in vitro*

### 2.1 Titulación de *C. trachomatis* por unidad formadora de inclusión

La concentración de *C. trachomatis* por unidad formadora de inclusiones (UFI), obtenida en cada una de las líneas celulares fue la siguiente: *HeLa*:  $2,4 \cdot 10^6$  UFI/mL.

*CaSki*:  $1,2 \cdot 10^6$  UFI/mL.

*C33A*:  $2,2 \cdot 10^6$  UFI/mL.

*C33AE6E7*:  $2 \cdot 10^6$  UFI/mL.

### 2.2 Titulación de HSV1 por ensayo de placa

El título viral de HSV1 por unidad formadora de placas (UFP), obtenido en células Vero clon 76 fue de  $5,8 \cdot 10^8$  UFP/mL.

Para la realización de cada uno de los modelos de infección descritos anteriormente, a las 24 y 48 horas, se calculó, según el título de *C. trachomatis* en cada línea celular, la concentración adecuada para infectar aproximadamente el 80% de la monocapa celular (Deka et al. 2007).

Para el caso de HSV1 también se utilizó el mismo criterio, lo que llevó a utilizar una concentración de 0,1 MOI para realizar las infecciones.

### 2.3. Cuantificación de ADNc

La concentración de ADNc total obtenido luego de la extracción de ARN y posterior retrotranscripción, para cada uno de los modelos de infección propuestos, por medición con Nanodrop se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Concentración de ADNc en las diferentes líneas celulares inoculadas con LGV y/o HSV1.

Muestra	Conc. ADNc	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
K1 (CaSki C 24hpi)	1173,6	ng/μL	23,473	14,987	1,57	1,87
K2 (CaSki LGV 24hpi)	893,2	ng/μL	17,864	11,487	1,56	1,79
K3 (CaSki CI 24hpi)	872,4	ng/μL	17,448	11,048	1,58	1,9
K4 (CaSki HSV1 24hpi)	791,4	ng/μL	15,828	10,063	1,57	1,82
K5 (CaSki C 48hpi)	1049,5	ng/μL	20,991	13,313	1,58	1,85
K6 (CaSki LGV 48hpi)	1044,4	ng/μL	20,888	13,284	1,57	1,84
K7 (CaSki CI 48hpi)	834,1	ng/μL	16,681	10,564	1,58	1,84
K8 (CaSki HSV1 48hpi)	1057	ng/μL	21,14	13,448	1,57	1,8
H1 (HeLa C 24hpi)	1053,5	ng/μL	21,069	13,357	1,58	1,86
H2 (HeLa LGV 24hpi)	1063	ng/μL	21,259	13,499	1,57	1,88
H3 (HeLa CI 24hpi)	1056,1	ng/μL	21,121	13,398	1,58	1,87
H4 (HeLa HSV1 24hpi)	1033,8	ng/μL	20,676	13,101	1,58	1,88
H5 (HeLa C 48hpi)	1064,9	ng/μL	21,299	13,523	1,57	1,86
H6 (HeLa LGV 48hpi)	1077,3	ng/μL	21,547	13,669	1,58	1,86
H7 (HeLa CI 48hpi)	1025	ng/μL	20,501	13,038	1,57	1,8
H8 (HeLa HSV1 48hpi)	1007,5	ng/μL	20,151	12,773	1,58	1,9
E1 (C33AE6E7 C 24hpi)	1166,7	ng/μL	23,333	14,71	1,59	1,86
E2 (C33AE6E7 LGV 24hpi)	1151,1	ng/μL	23,022	14,233	1,62	1,81
E3 (C33AE6E7 HSV1 24hpi)	1143,8	ng/μL	22,875	14,174	1,61	1,77
E4 (C33AE6E7 CI 24hpi)	1098,5	ng/μL	21,97	13,709	1,6	1,8
E5 (C33AE6E7 C 48hpi)	1086,5	ng/μL	21,73	13,425	1,62	1,76
E6 (C33AE6E7 LGV 48hpi)	1073,8	ng/μL	21,476	13,385	1,6	1,8
E7 (C33AE6E7 HSV1 48hpi)	1146,5	ng/μL	22,93	14,207	1,61	1,8
E8 (C33AE6E7 CI 48hpi)	966	ng/μL	19,32	11,993	1,61	1,81
C1 (C33A C 24hpi)	2688,2	ng/μL	53,764	32,686	1,64	1,87
C2 (C33A LGV 24hpi)	1244,8	ng/μL	24,896	15,215	1,64	1,79
C3 (C33A HSV1 24hpi)	1327,8	ng/μL	26,557	16,179	1,64	1,87
C4 (C33A CI 24hpi)	1292,1	ng/μL	25,842	15,771	1,64	1,87
C5 (C33A C 48hpi)	1323,4	ng/μL	26,467	16,158	1,64	1,86
C6 (C33A LGV 48hpi)	1358,1	ng/μL	27,163	16,593	1,64	1,83
C7 (C33A HSV1 48hpi)	1229,4	ng/μL	24,588	15,033	1,64	1,85
C8 (C33A CI 48hpi)	1206,8	ng/μL	24,136	14,714	1,64	1,89

**C:** Control (sin LGV y HSV1)- **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV+HSV1. hpi: horas post infección.

## 2.4. Estudio de la expresión de los oncogenes E6 y E7

Utilizando el ADNc obtenido de cada modelo de infección, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los oncogenes E6 y E7 en aquellas líneas celulares que contenían el genoma de HPV (CaSki, C33AE6E7 y HeLa).

Para la cuantificación se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión de los genes como una diferencia relativa entre el gen blanco y el endógeno.

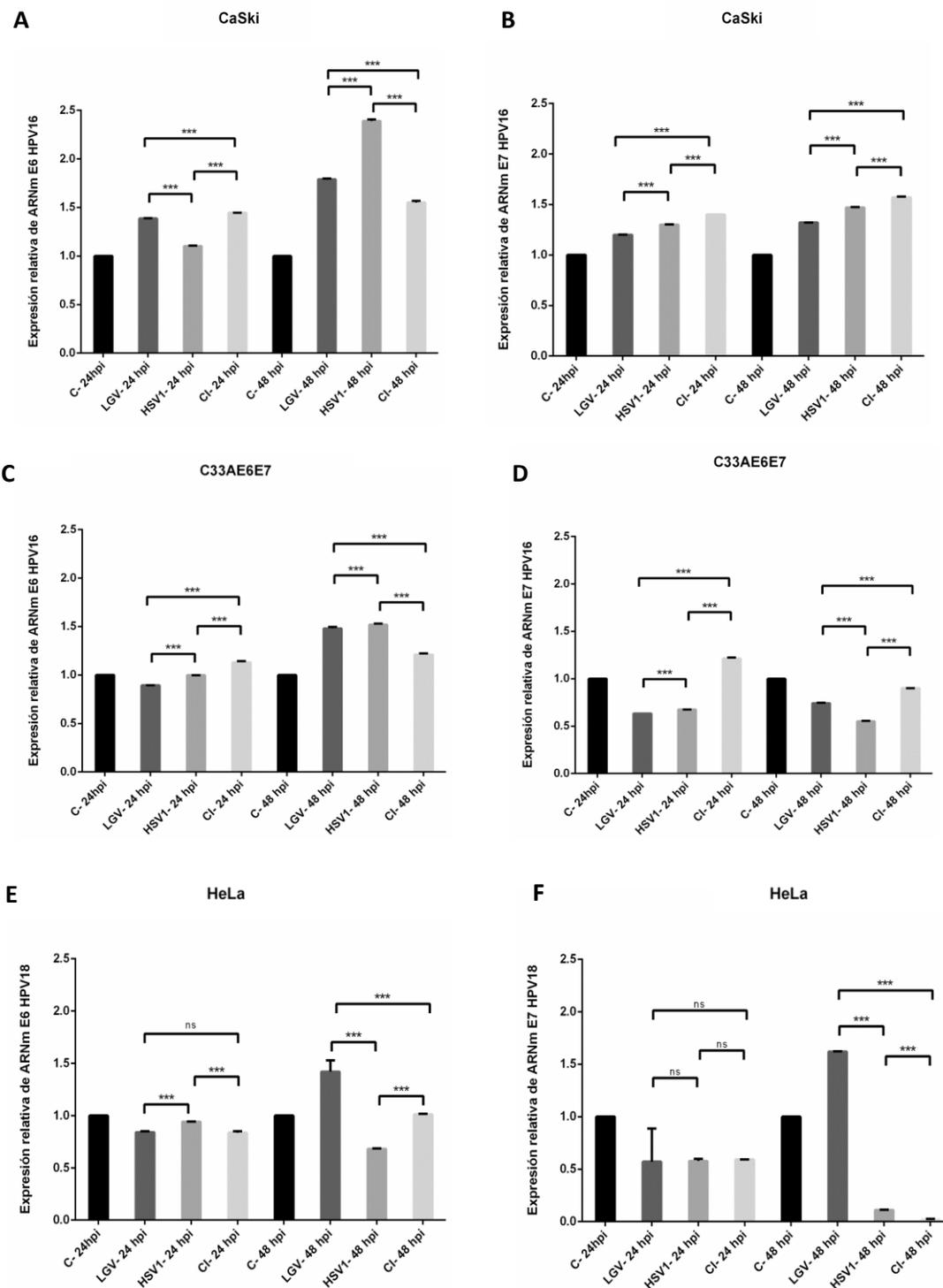
En relación al oncogén E6, para la línea celular CaSki (Figura 5A), se observa un aumento significativo de la expresión, tanto a las 24 como a las 48 hpi, frente a todos los tipos de infección realizadas (*C. trachomatis*, HSV1 y co- infección de ambos), comparadas con el control sin infectar con estos agentes. Para el caso de la línea celular C33AE6E7 (Figura 5C), transfectada con el genoma de E6 y E7 del mismo genotipo que la línea celular CaSki (HPV16), se observó un marcado aumento de la expresión de E6 frente a la co- infección con *C. trachomatis* y HSV1, particularmente a las 48 hpi.

En el estudio de células HeLa (Figura 5E) infectada persistentemente por HPV18, un aumento de la expresión de E6 ocurrió a las 48 hpi, frente a *C. trachomatis* y co- infección de *C. trachomatis* y HSV1, si bien a las 24 hpi no fue evidente. No ocurrió lo mismo cuando las células fueron infectadas sólo con HSV1, donde se observó una disminución de la expresión de E6 a las 48 hpi.

En relación a la expresión de E7, pudimos ver que los niveles de expresión de este oncogén, no se comportaron de igual manera que E6, lo que concuerda con lo observado en la cuantificación de las muestras de los pacientes *in Vivo* (resultados del apartado 1.2).

Para el caso de células CaSki (Figura 5B) se observó aumento de la expresión de E7 en todas las infecciones realizadas tanto a las 24 como a las 48 hpi, pero no ocurrió lo mismo con las células C33AE6E7 (Figura 5D), en las cuales se produjo una disminución de la expresión, a excepción de la infección *C. trachomatis* + HSV1, que si bien, aumentó a las 24 hpi, luego disminuyó a las 48 hpi. Se debe destacar que si bien, ambas líneas celulares tienen los genes E6 y E7 del HPV16, son muy diferentes entre sí, ya que la línea celular C33AE6E7 contiene sólo esa porción del genoma de HPV16, a diferencia de CaSki, la cual contiene integrado el genoma completo de HPV16.

Para el estudio de la expresión de E7 en el modelo *in vitro* con células HeLa (Figura 5F), se observó un marcado aumento de la expresión a las 48 hpi sólo frente a la infección por *C. trachomatis* similar a lo que ocurrió en esta línea celular para la expresión de E6. Sin embargo, se produjo una marcada disminución de la expresión de E7 en el resto de las situaciones, a las 24 hpi; siendo más marcada aún a las 48 hpi.



**Figura 5.** Expresión relativa de los oncogenes E6 (A, C, E) y E7 (B, D, F) de HPV16 y 18 frente a las diferentes infecciones. C: control (sin LGV y HSV1), LGV: *C. trachomatis* serovar LGV L2- HSV1: Virus Herpes Simple 1- CI: Co- infección LGV2+HSV1. hpi: horas pos infección (\*\*\*= p<0,001).

## 2.5. Estudio de la localización e intensidad de fluorescencia de p53

Mediante la utilización del anticuerpo específico para la proteína p53 y colorante nuclear Hoechst, se realizó una inmunofluorescencia indirecta en cada una de las líneas celulares, infectadas por *C. trachomatis* y por HSV1, fijadas a dos tiempos de infección diferentes: 24 y 48 hpi.

Se observa que en las líneas infectadas persistentemente por HPV (HeLa: Figuras 6- 7 y CaSki: Figuras 8- 9), la proteína p53 se localiza preferentemente en el citoplasma celular. Caso contrario, en la línea C33A (Figuras 10- 11), negativa para HPV, la localización de p53 se encuentra mayormente concentrada en el núcleo de la célula.

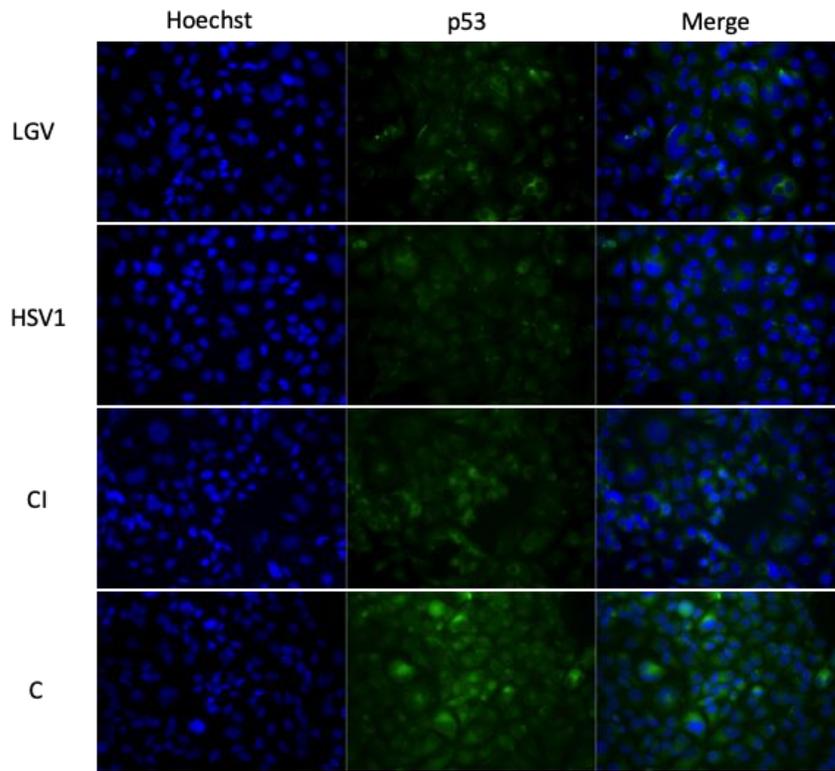
Se debe tener en cuenta además que las líneas celulares CaSki y HeLa expresan p53 en bajas cantidades y contienen p53 de tipo salvaje, a diferencia de las células C33A, en las cuales p53 se expresa en altas cantidades y contienen una mutación puntual en el codón 273 resultando en una sustitución de aminoácidos arginina por cisteína, según datos del ATCC.

En la línea celular transfectada con los oncogenes del HPV16, C33AE6E7 (Figuras 12- 13), se pudo observar células en las que al igual que en C33A, la fluorescencia de p53 se visualiza en el núcleo, y otras células en el mismo campo, en las cuales la fluorescencia de p53 se observa en el citoplasma celular (al igual que en las líneas CaSki y HeLa).

Si bien, por estos experimentos de inmunofluorescencia no podemos determinar de manera específica si existe una disminución significativa de expresión de p53, como así tampoco las vías de señalización que se activan; se pudo observar las diferencias entre la línea celular C33A y C33AE6E7 respecto a la localización de p53 como se describió anteriormente.

Tanto en células CaSki como en células HeLa (Figuras 6- 7- 8- 9) se puede ver una disminución de la intensidad de fluorescencia en la detección de p53 frente a las coinfecciones, siendo ésta más clara frente a la infección con *C. trachomatis*. En cambio, en la línea celular C33A, no se observan diferencias en la intensidad de fluorescencia frente a las diferentes infecciones realizadas, teniendo en cuenta además que esta línea celular es negativa para HPV. En relación a las células C33AE6E7, se observaron, además de la particular localización de fluorescencia en el citoplasma, una disminución de la intensidad

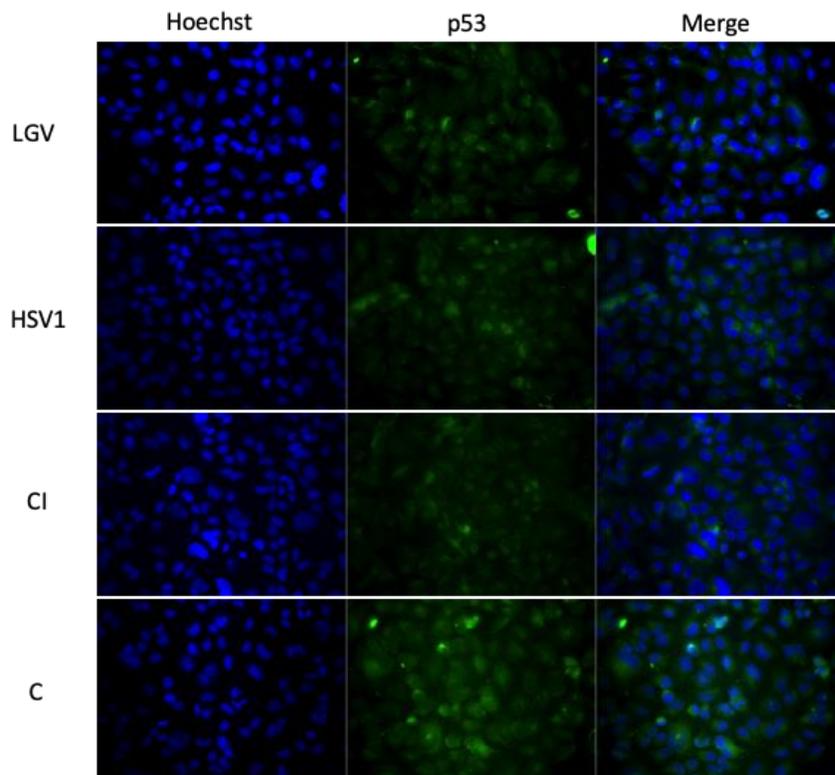
de fluorescencia de p53 ante la co- infección con *C. trachomatis*, coincidente con lo observado en las líneas CaSki y HeLa.



**Figura 6.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células HeLa a las 24 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente en el citoplasma celular.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

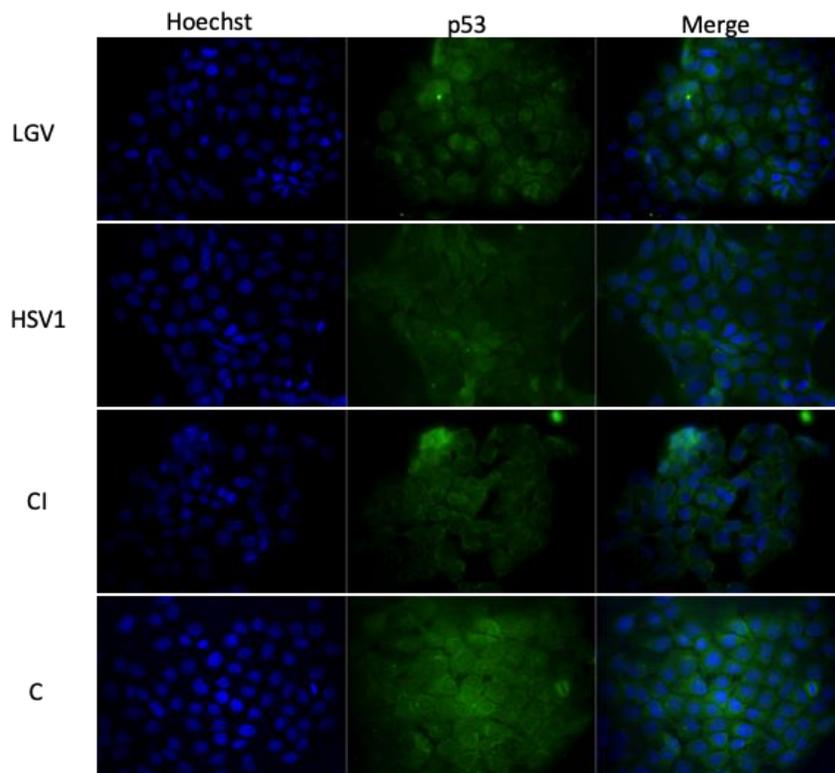
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 7.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células HeLa a las 48 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente en el citoplasma celular.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

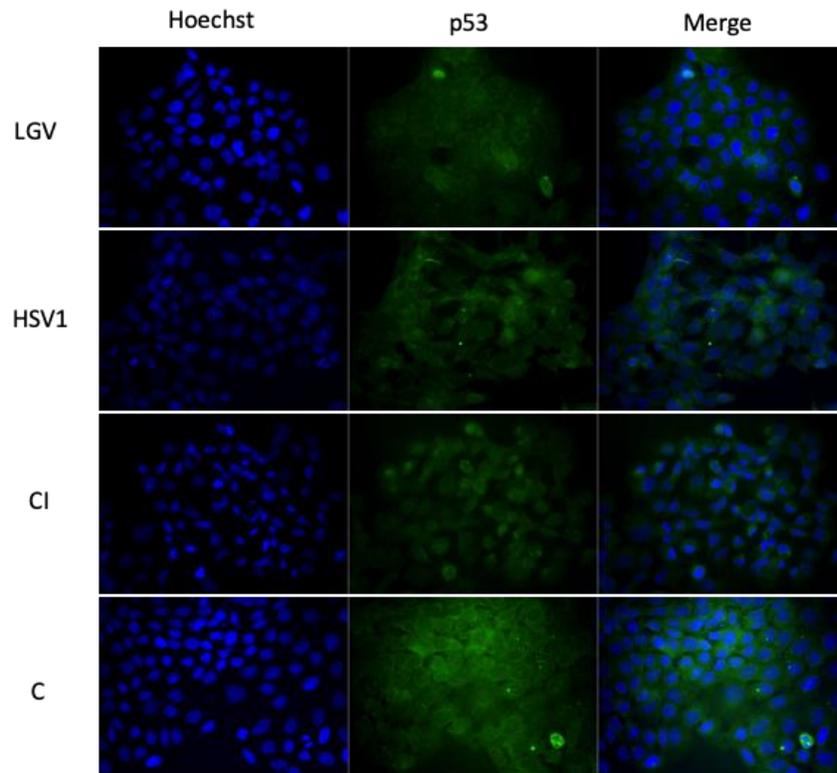
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 8.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células CaSki a las 24 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente en el citoplasma celular.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

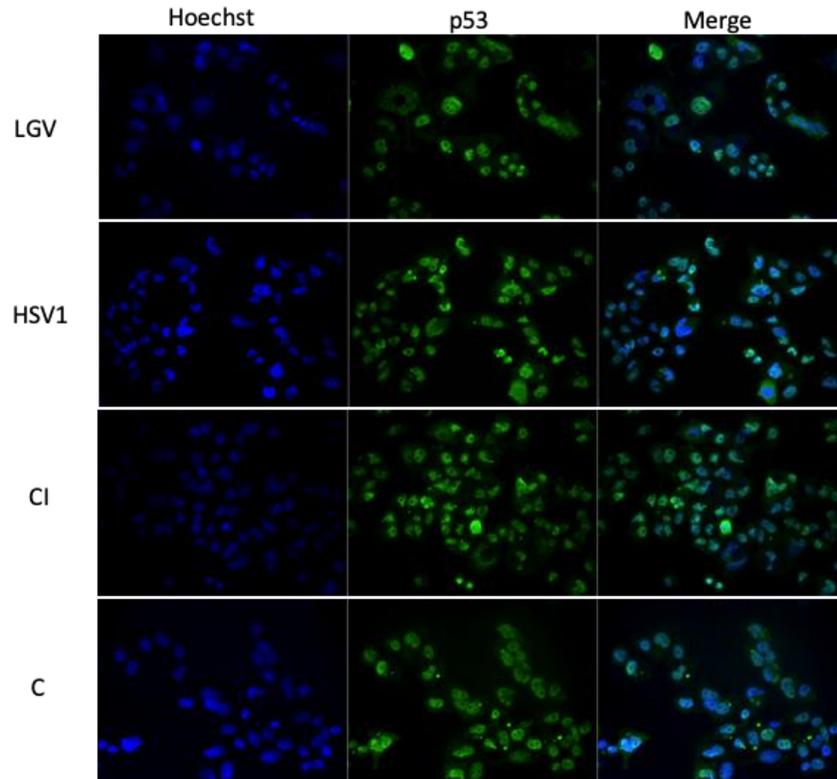
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 9.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células CaSki a las 48 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente en el citoplasma celular.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

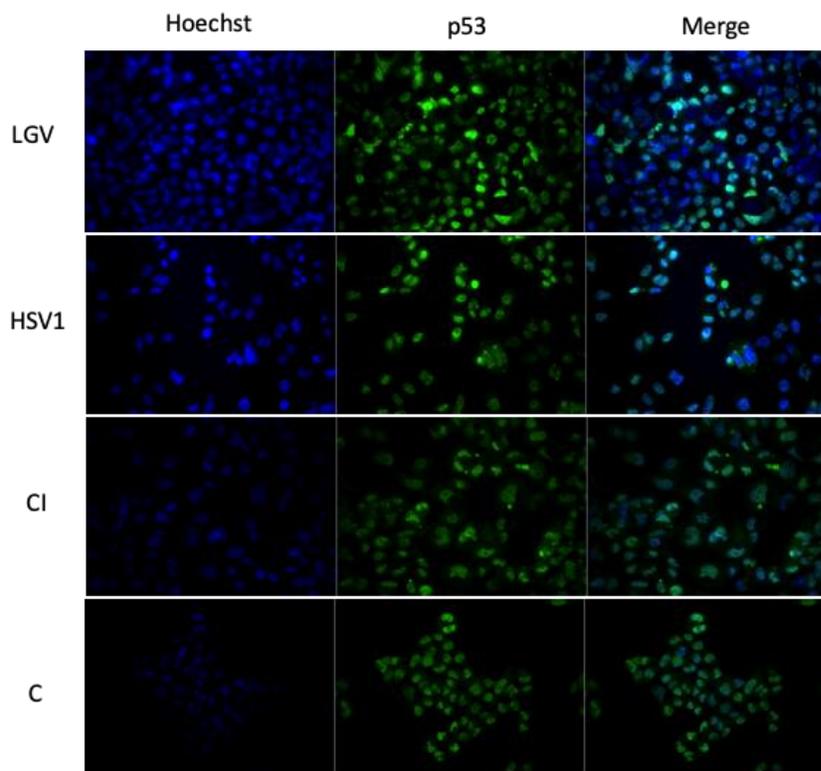
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 10.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células C33A a las 24 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente concentrada en los núcleos de las células.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

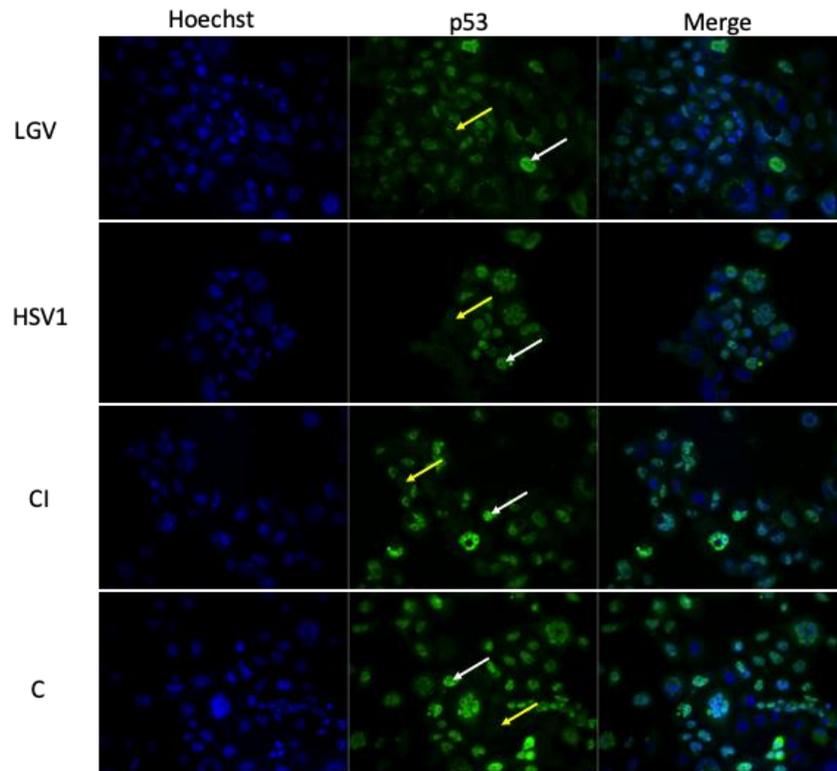
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 11.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células C33A a las 48 hpi. La marcación de p53 se observa preferentemente concentrada en los núcleos de las células.

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

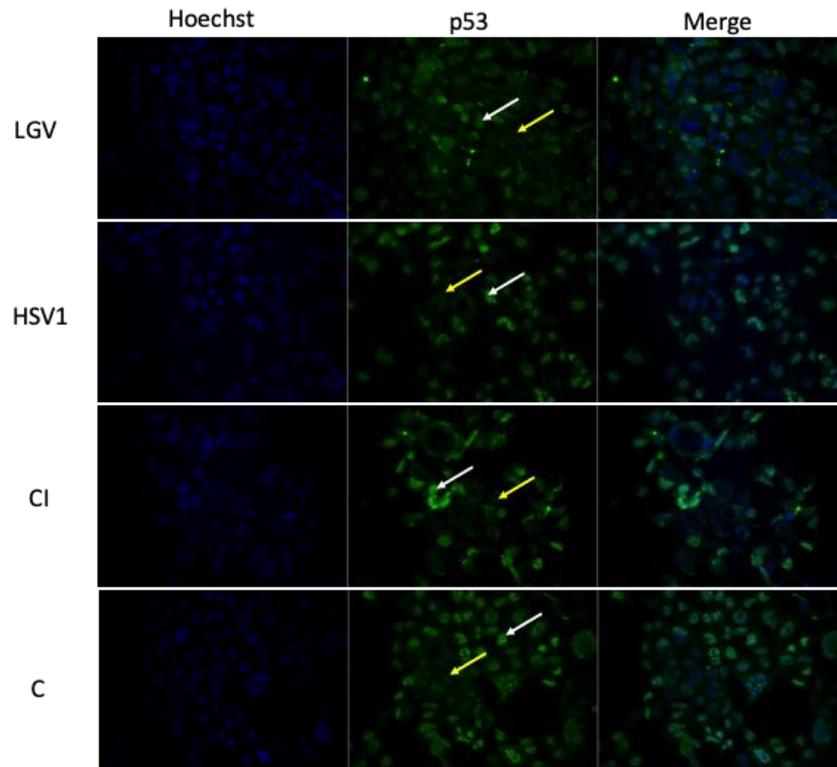
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 12.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células C33AE6E7 a las 24 hpi. La marcación de p53 se observa, en algunas células, concentrada en los núcleos (flechas blancas) y en otras de una manera más difusa en el citoplasma celular (flechas amarillas).

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 13.** Inmunofluorescencia indirecta contra proteína p53 en células C33AE6E7 a las 48 hpi. La marcación de p53 se observa, en algunas células concentrada en los núcleos (flechas blancas) y en otras de una manera más difusa en el citoplasma celular (flechas amarillas).

**LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1-

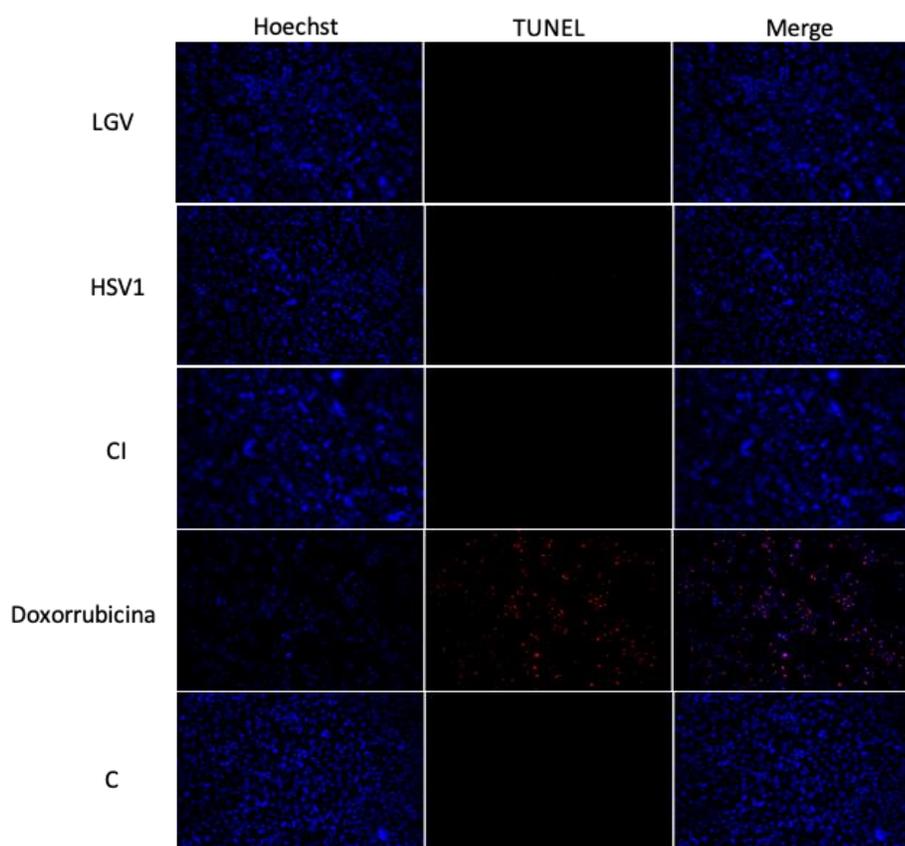
**CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).

## 2.6 Estudio de apoptosis

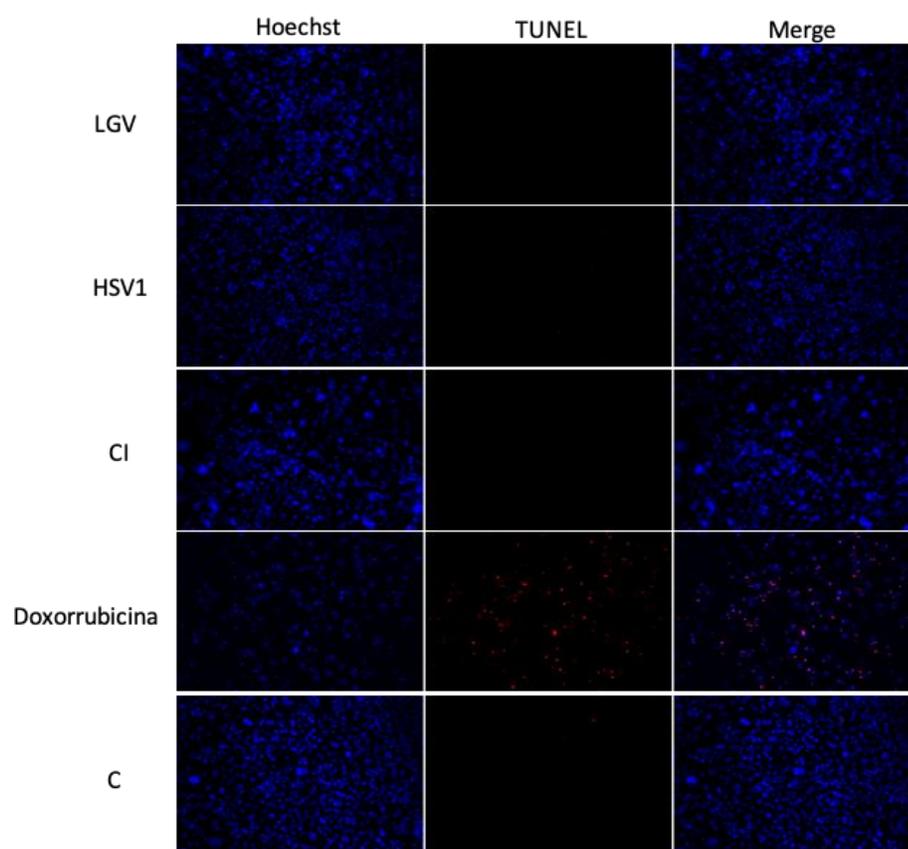
Utilizando la tinción de TUNEL y colorante nuclear Hoechst, se determinó la presencia de apoptosis en cada uno de los modelos de infección *in vitro* a las 24 y 48 hpi.

No se observaron procesos apoptóticos en las líneas celulares estudiadas (HeLa figuras 14- 15; CaSki figuras 16- 17; C33A figuras 18- 19 y C33AE6E7 figuras 20- 21), mostrando la resistencia a apoptosis frente a la infección por *C. trachomatis* y por HSV1.

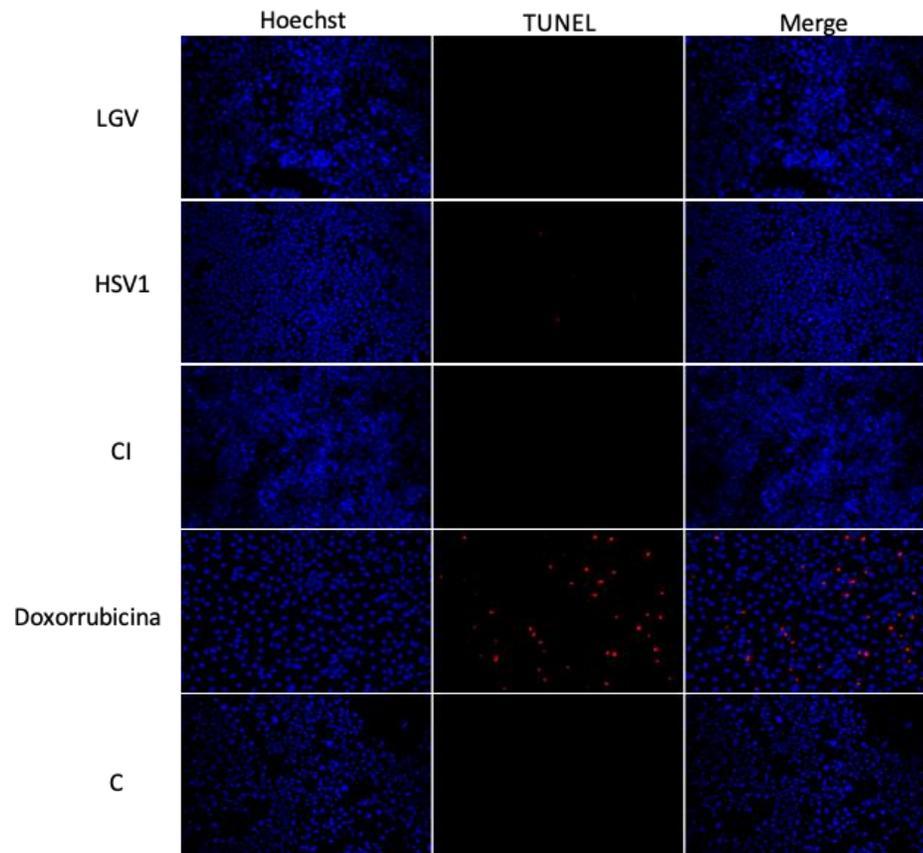
Como control positivo de apoptosis se utilizó el tratamiento con doxorrubicina en cada una de las monocapas celulares; donde se observó que todas ellas fueron susceptibles al estímulo apoptótico agregado.



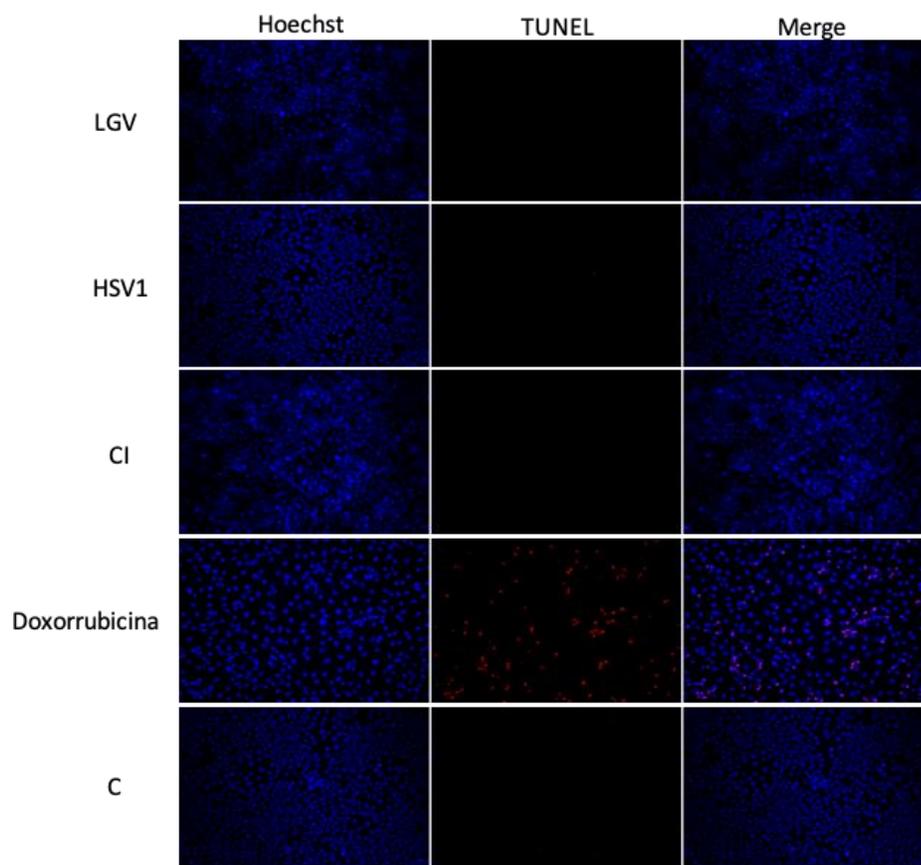
**Figura 14.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células HeLa a las 24 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



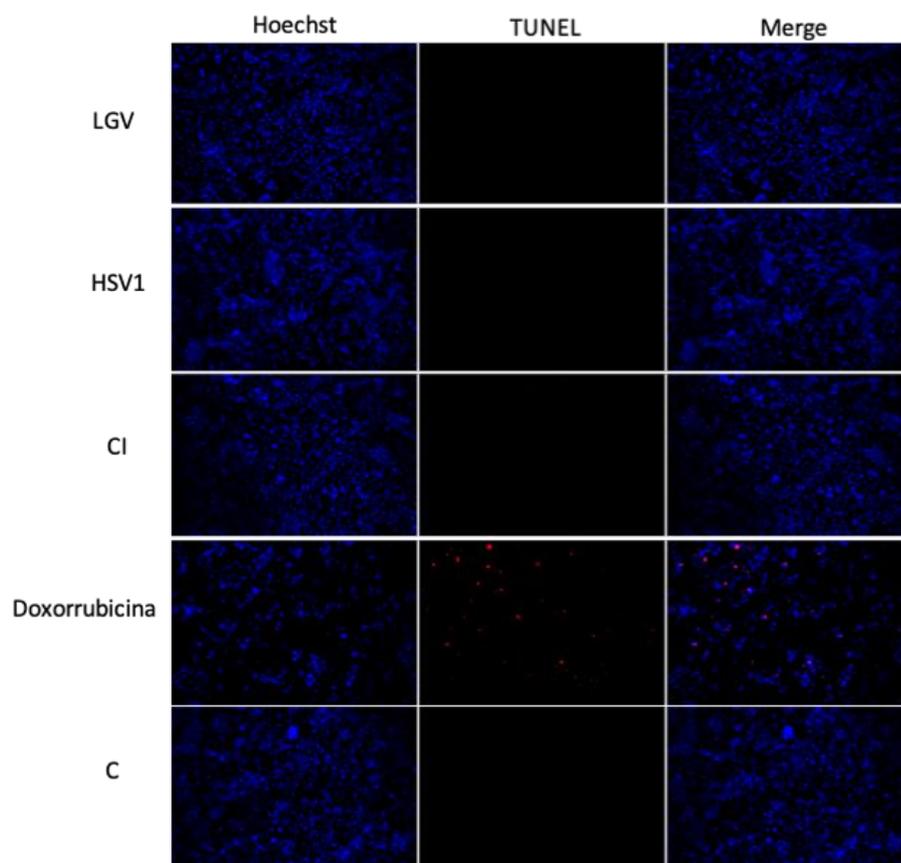
**Figura 15** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células HeLa a las 48 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



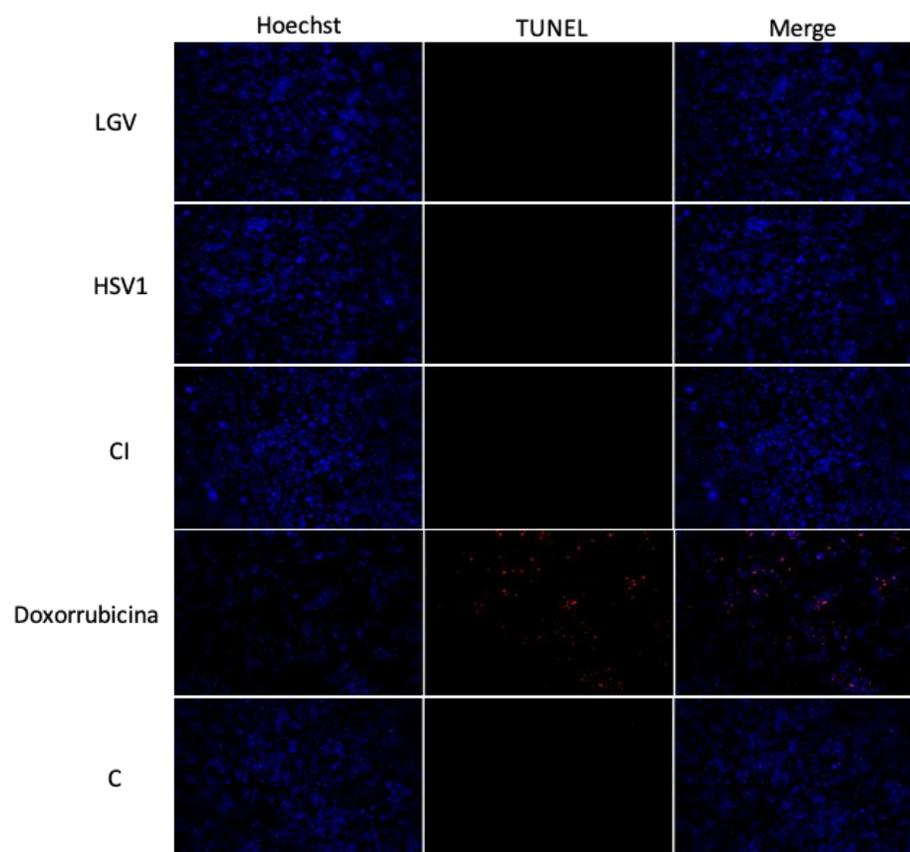
**Figura 16.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células CaSki a las 24 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



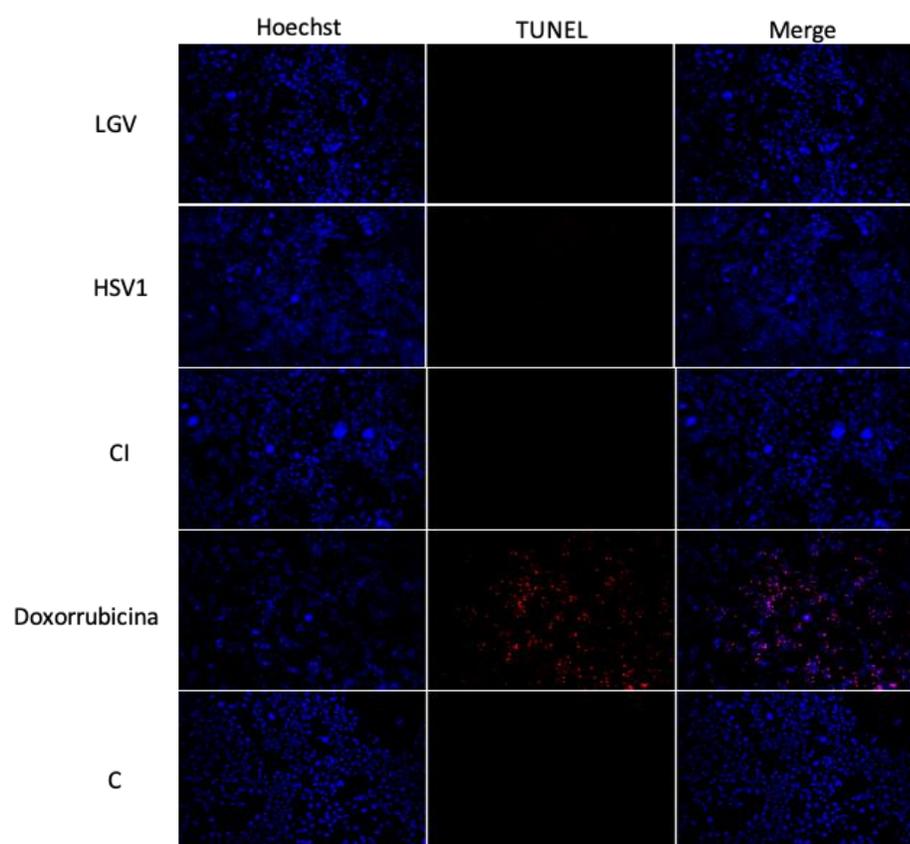
**Figura 17.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células CaSki a las 48 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



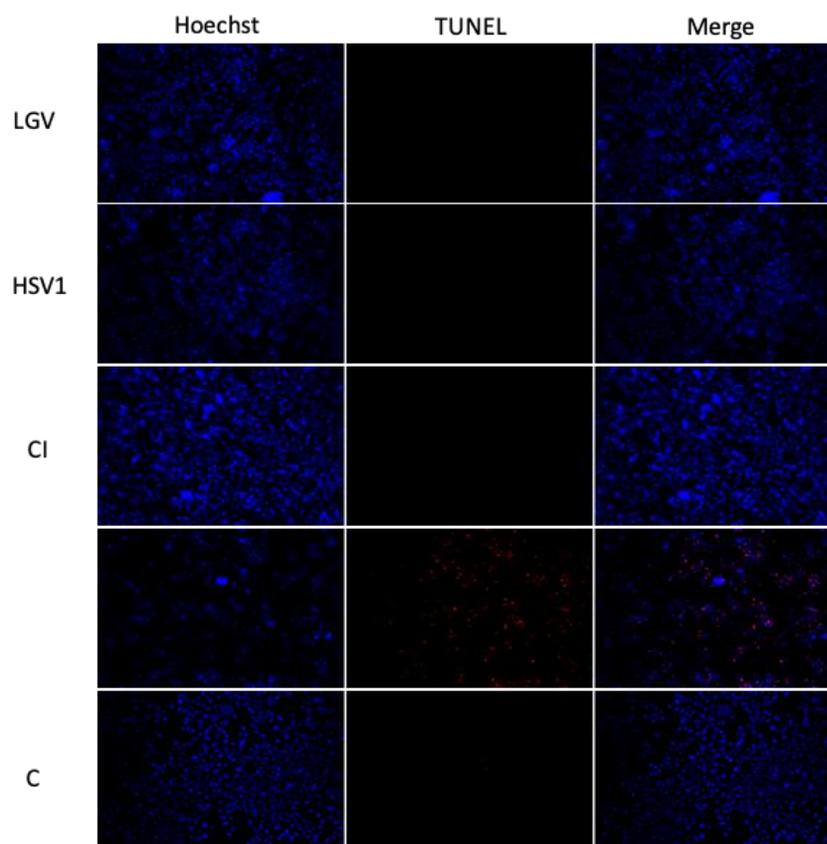
**Figura 18.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células C33A a las 24 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 19** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células C33A a las 48 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 20.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células C33AE6E7 a las 24 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1).



**Figura 21.** Marcación de apoptosis por tinción de TUNEL en células C33AE6E7 a las 48 hpi. **LGV:** *C. trachomatis* serovar LGV L2- **HSV1:** Virus Herpes Simple 1- **CI:** Co-infección LGV2+HSV1. **C:** Control (sin LGV y HSV1)

# *Capítulo V*

---

Discusión

---

## DISCUSIÓN

### 1. Estudios en pacientes

#### 1.1 Infecciones de transmisión sexual en la cavidad oral: HPV, *C. trachomatis* y HSV

Actualmente, la transmisión oral de HPV está restringida principalmente a la salud de la mucosa bucal. Sin embargo, los diferentes hábitos sexuales, como la edad temprana de inicio de relaciones sexuales, el aumento del número de parejas sexuales y los hábitos sexuales orogenitales en particular, hicieron que la infección por HPV sea endémica (Candotto et al. 2017). Y en relación al cáncer de cabeza y cuello y su asociación con ITS, varios estudios demostraron la importancia de las infecciones virales en la carcinogénesis (Metgud et al. 2012, Benson et al. 2014, Drop et al. 2017).

Debido a que la histología de la mucosa oral se asemeja a la del cuello uterino; podemos asumir que HPV y otras ITS que se detectan comúnmente en áreas genitales, pueden estar presentes también en diferentes lesiones de la mucosa oral. Se estima que la población adulta sexualmente activa estuvo expuesta a HPV, en cualquier sitio anatómico, en algún momento de sus vidas (Sun et al. 2017).

Las primeras investigaciones acerca de la infección por HPV particularmente en la cavidad oral, reportaron de la presencia del virus en varias lesiones orales benignas, especialmente en verruga vulgar, papilomas escamosos e hiperplasia epitelial focal (Candotto et al. 2017); por otro lado, con respecto a la transformación maligna (OSCC), esta patología puede presentar diferentes aspectos clínicos relacionados con la localización del tumor, lesiones precancerosas y factores de riesgo asociados (Agua and Lanfranchi 2004). Frente a una infección por HPV, la posibilidad de evolucionar hacia una neoplasia maligna depende del genotipo viral, la acción sinérgica con diferentes agentes físicos, químicos y biológicos, la constitución genética y los mecanismos de defensa inmune del hospedador, los cuales pueden modificar el curso de la infección por HPV. En el caso de la infección por HPV de alto riesgo y en condiciones favorables para la oncogenicidad, el

---

genoma viral se integra en el genoma del hospedador, evento necesario para la inmortalidad de los queratinocitos y con el consecuente desarrollo de la lesión maligna (Gupta and Gupta 2015).

En el presente estudio, la prevalencia de HPV en las lesiones de la cavidad oral fue del 34%, similar a lo reportado anteriormente en diferentes lugares del mundo como así también en Argentina. Así, Syrjanen et al, detectaron en la población de Finlandia una prevalencia de HPV oral del 15% al 24% en mujeres y del 15% al 31% en sus cónyuges masculinos durante un seguimiento de 6 años, siendo el HPV16 el más prevalente, coincidente con lo detectado en este trabajo (Syrjanen 2018). Mravak-Stipetic et al, en un estudio realizado en muestras de mucosa oral de pacientes croatas, encontraron que el HPV era significativamente más frecuente en lesiones orales clínicamente visibles (17,7%) en comparación con pacientes con mucosa normal (Mravak-Stipetic et al. 2013). En otros estudios brasileños, la tasa de detección de HPV en las lesiones orales fue del 81% (Ribeiro et al. 2017) y del 25,6% (Petito et al. 2017) y en un estudio realizado con pacientes chilenos, se detectó un 11% de HPV positivos en muestras de cáncer oral (Reyes et al. 2015). En base a estos resultados, se observa que la tasa de detección de HPV en cavidad oral varía ampliamente en los diferentes lugares del mundo. Estas diferencias podrían estar asociadas a los diferentes tipos de muestras recolectadas en cada estudio en particular, el tipo de técnica de detección que se utiliza, los diferentes hábitos de las poblaciones estudiadas, a las patologías orales presentes en los pacientes estudiados y a la prevalencia y circulación viral del área que se estudia (Gupta and Gupta 2015).

Respecto a la detección previa de HPV bucal en Argentina, un estudio realizado en Buenos Aires, mostró un 55,8% de prevalencia de HPV en la cavidad oral, mayor que la detectada en el presente estudio. Los genotipos identificados, HPV6, HPV11 y HPV16, están en concordancia con nuestros resultados (Gonzalez et al. 2007). Asimismo, otro estudio realizado en Buenos Aires, detectó un 32,5% de HPV positivos en las lesiones orales (Gutierrez et al. 2006), prevalencia muy similar a nuestros resultados. Sumado a esto, en un trabajo previo realizado en la ciudad de Córdoba, detectamos un 56,2% de HPV en pacientes con lesiones orales de diferentes grados de severidad (Venezuela et al. 2013).

---

En los últimos años, un estudio realizado en México describió asociación entre HPV y OSCC con predominio de los genotipos HPV16 y HPV18 (de la Fuente Hernández et al. 2014); sin embargo, en el presente estudio no se detectó HPV18 en ninguno de los pacientes analizados. En este sentido, Syrjanen (Syrjanen 2003) demostró que la infección por HPV16 es casi 13 veces más frecuente en orofaringe y 4 veces más frecuente en OSCC, que en mucosas orales sin lesiones. Similar a lo detectado en nuestro estudio, Mravak-Stopetic detectó, en una población croata, una mayor prevalencia de los tipos de HPV de alto riesgo en los PMOD, por lo que este tipo de lesiones requiere ser controladas y tratadas periódicamente (Mravak-Stipetic et al. 2013). Sin embargo, la prevalencia de HPV en PMOD posee un amplio rango de detección (0-85%) con una mayor frecuencia de HPV16 y 18. Con respecto a si la infección por HPV desempeña un papel en la aparición de PMOD o tiene un papel de pronóstico negativo, aún la evidencia científica que respalda es bastante limitada y controvertida, no pudiendo excluir la hipótesis de que la presencia de la lesión facilita la entrada del virus (Candotto et al. 2017).

Las infecciones asintomáticas en las que se puede detectar el ADN de HPV sin ninguna lesión clínica son todavía un tema de debate. Kreimer publicó, en una revisión bibliográfica, que la infección oral asintomática por HPV16 se encontró en el 1,3% en los casi 4.000 sujetos incluidos en el estudio y otros tipos de HPV diferentes del 16 en el 4,5% (Kreimer et al. 2010). En estudios previos de nuestro grupo en Córdoba, no detectamos HPV en mucosa oral sin lesión, en el primero de los trabajos publicados (Venezuela et al. 2013) y en un segundo estudio realizado con sujetos voluntarios seleccionados al azar, detectamos 3% (13/401) de HPV positivos siendo todos los genotipos identificados de bajo riesgo. La mayoría de ellos mostraron alguna lesión relacionada con irritación mecánica crónica y no se encontró ninguna manifestación clínica sugestiva de infección por HPV en ninguno de los sujetos positivos (Criscuolo et al. 2018). Sin embargo, a nivel mundial el rango de prevalencia oral de HPV en mucosa oral sin lesiones, al igual que ocurre con las mucosas con lesiones, es muy amplio y está influenciado por las diferencias demográficas y étnicas de las poblaciones investigadas como así también por los diferentes procedimientos de diagnóstico (Candotto et al. 2017).

---

Algunas lesiones asociadas a la infección por HPV son muy pequeñas o están ubicadas profundamente en los tejidos y están ocultas de la detección clínica. Actualmente no existen métodos estandarizados para la detección de estas infecciones asociadas a lesiones orales, fuera del examen visual y táctil convencional que facilite el diagnóstico temprano. Se consideró que la prueba de saliva para detectar la presencia de HPV era prometedora para la detección temprana del virus en este tipo de lesiones, pero finalmente se descubrió que no tenía suficiente sensibilidad y especificidad. Por lo cual, la detección de ADN viral en muestras de lesiones, sigue siendo la técnica utilizada para la determinar la participación de HPV en las lesiones de la cavidad bucal (Burd 2016).

Por otro lado, los tumores malignos asociados con agentes infecciosos pueden ser el resultado de una latencia prolongada como consecuencia de infecciones crónicas. Las infecciones patogénicas son necesarias, pero no suficientes para la iniciación o progresión del cáncer. En pacientes infectados con un virus, la co- infección secundaria con otro virus puede servir como un cofactor importante que puede causar la iniciación y / o progresión de los tumores (Drop et al. 2017). En la literatura, los estudios de virus de transmisión sexual en lesiones de la cavidad bucal generalmente se limitan a la búsqueda de HPV, por lo que se sabe poco acerca de la presencia y la co- infección con otros agentes de infección como *C. trachomatis* y HSV. Los hallazgos actuales confirman que nuestro conocimiento sobre la variedad de agentes infecciosos en la cavidad oral es solo parcial (Rautava et al. 2012).

En las últimas dos décadas varios posibles factores de riesgo se asociaron con las infecciones persistentes por HPV de alto riesgo, que contribuirían a la carcinogénesis. Los cofactores relacionados con el estilo de vida del paciente, como el consumo de tabaco, de alcohol y anticonceptivos hormonales, el inicio temprano de la actividad sexual y múltiples parejas sexuales se asociaron con carcinomas de células escamosas. La variabilidad genética del hospedador, las variaciones intratípicas del HPV, la infección con múltiples genotipos de HPV y la co- infección con otros agentes se asocian con la persistencia y progresión de una afección premaligna a cáncer. Esta asociación se ha estudiado desde 1989, cuando Schmauz et al. publicaron que la infección por múltiples ITS era un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer y sugirieron que las ITS adicionales pueden actuar como cofactores del HPV (Schmauz et al. 1989). El HSV y *C. trachomatis* han demostrado ser la

evidencia más consistente de una asociación con el HPV. Sin embargo, no hay consenso sobre el impacto de otros patógenos diferentes de éstos en asociación con HPV y la progresión de las lesiones (de Abreu et al. 2016).

La co- infección de HPV y *Chlamydia trachomatis* se considera un posible cofactor que puede conducir de la infección a la oncogénesis. Se observaron asociaciones positivas entre la infección por *C. trachomatis* y el carcinoma de células escamosas del cuello uterino o sus lesiones precursoras en la mayoría de los estudios epidemiológicos que controlan la infección por HPV (Jenkins et al. 2015). Un hecho importante para destacar es que la infección por *C. trachomatis* puede alterar la estructura normal de las uniones de las células epiteliales, aumentando la susceptibilidad a la infección por HPV, tanto en la mucosa oral como en la genital. Una posible explicación biológica del aumento del riesgo de co- infección es que *C. trachomatis* causa una inflamación local que provoca un daño del tejido epitelial, lo que podría dejar a la persona más susceptible a otras infecciones (Vriend et al. 2015).

Estudios recientes han propuesto que la infección por *C. trachomatis* puede contribuir a la carcinogénesis por su impacto sobre la estructura de la célula hospedadora y por la regulación de genes intracelulares. Por un lado, el epitelio infectado experimenta lesiones, lo que conlleva a una inflamación crónica persistente y, por otro lado, se ha observado un incremento en la señalización oncogénica, disminución de la expresión de genes supresores de tumores como p53, proliferación continua e inhibición de la apoptosis (Jenkins, 2015). Sin embargo, no está claro aún si *C. trachomatis* tiene efecto en el desarrollo del cáncer en ambas situaciones: infección única por *C. trachomatis* y en el caso de co- infección de HPV y *C. trachomatis*, y poco se sabe de los mecanismos moleculares subyacentes a este efecto oncogénico (Zhu et al. 2016).

Los valores informados de la prevalencia de *C. trachomatis* en la cavidad oral difieren ampliamente entre los estudios publicados. En hombres con lesiones orales, nuestros resultados mostraron un 18% de positividad para *C. trachomatis*. En la población japonesa, se detectó *C. trachomatis* en una prevalencia de 4,2% en muestras de saliva, 6% en hisopado faríngeo, 10% en fluído oral (Nakashima et al. 2014); mientras que otro autor japonés reportó 3% también en fluido oral (Hamasuna et al. 2007). En un estudio realizado

en los Países Bajos, se detectó *C. trachomatis* en hisopado faríngeo en el 1,1% de hombres que tienen sexo con hombres (van Rooijen et al. 2015). Nuestro estudio detectó un 16% de *C. trachomatis* en lesiones orales de mujeres. La frecuencia de detección varía ampliamente, lo mismo que ocurre en los hombres. En los Países Bajos, se detectó un 2,3% (van Rooijen et al. 2015), en la población japonesa se detectó un 44% de *C. trachomatis* en frotis faríngeos y un 61% en fluido oral en trabajadoras sexuales (Hamasuna et al. 2007).

Una revisión que incluyó estudios que describieron infecciones extragenitales por *C. trachomatis*, realizada en Estados Unidos, mostró una prevalencia de 0,2 a 3,2% en hisopados faríngeos de mujeres asintomáticas, 0 a 3,6% en hombres que tienen sexo con hombres, ambas prevalencias más bajas que las detectadas en nuestro estudio; y 0- 22% en hombres que tienen sexo con mujeres, siendo este último dato más cercano a la prevalencia detectada en hombres en nuestro estudio (Chan et al. 2016). Sin embargo, una limitación de nuestro trabajo, es que, a diferencia de los descriptos anteriormente, no contamos con datos acerca de las prácticas sexuales de nuestros pacientes.

Es importante destacar además que no se cuenta con resultados acerca de la prevalencia de *C. trachomatis* en cavidad oral en Argentina, siendo estos datos los primeros informes acerca de dicha infección en la población de Córdoba (Mosmann et al. 2019).

Respecto a HSV, se describió que el contacto directo con lesiones o con secreciones orales o genitales infectadas, incluso en pacientes asintomáticos, puede ser una forma de transmisión de este virus (Ramchandani et al. 2016). Las infecciones orales y genitales por HSV pueden predisponer a la infección por HPV. Los posibles mecanismos incluyen que la infección por HSV permite un mejor acceso del HPV a la capa de células basales para el establecimiento de la infección (Guidry and Scott 2017). Un estudio reciente mostró que los carcinomas orales coinfectados con HPV16 y HSV1 tuvieron un resultado menos favorable al tratamiento (Maki et al. 2018).

Aunque se esperaría una alta frecuencia de HSV en la cavidad oral, en este estudio la prevalencia detectada fue relativamente baja (3%). Es importante destacar que, esto podría deberse al hecho de que aquellos pacientes con lesiones compatibles a una infección por HSV no fueron estudiados (criterio de exclusión), ya que, por protocolo de bioseguridad, tanto para el odontólogo como para el paciente, los profesionales deciden no obtener

muestras de esas lesiones, evitando así la posibilidad de diseminar las partículas virales infectivas del HSV sobre la mucosa oral sana del paciente. En caso de presentar lesiones herpéticas visibles, los pacientes recibieron tratamiento antiviral y luego se procedió a tomar la muestra en una nueva visita odontológica o estomatológica. Sin embargo, consideramos importante realizar la detección del ADN de HSV, a fin de determinar la presencia de este tipo de infecciones aún en lesiones no compatibles con HSV.

La mayoría de las lesiones positivas para HSV fueron benignas y en pacientes de sexo femenino, hallándose tanto HSV1 como HSV2; no se encontraron co- infecciones de HSV1 y HSV2. En un estudio realizado en Suecia, se detectó HSV1 en el 36% de muestras de PMOD y en el 52% de OSCC, prevalencias más altas que las detectadas en este trabajo (Jalouli et al. 2015). Esto concuerda con un estudio previo en pacientes asintomáticos de Finlandia encontró que solo el 3% y el 2,8% de pacientes sexo femenino y masculino, respectivamente, resultaron positivos al HSV1 en muestras de cepillado de mucosa oral sin lesiones compatibles con HPV ni con HSV. En este último estudio también se evaluó la co- infección HSV1 y HPV, el resultado mostró que la infección por HSV1 y HPV en la mucosa oral de las mujeres jóvenes es poco frecuente, encontrándose solo en el 0.2% (Maki et al. 2018). En nuestro estudio, detectamos un valor similar, de solo el 0,3% de esta co- infección siendo la co- infección más frecuente HSV- *C. trachomatis* (4%). Otro estudio realizado en EE. UU, aisló a partir de muestras de mucosa oral, HSV2 con menos frecuencia que el HSV1 (0,06% y 1% respectivamente) en personas con anticuerpo contra HSV1 y HSV2 (Wald et al. 2004). Si bien en este trabajo fue menor la detección de HSV2 en relación a HSV1, otros autores demostraron que la co- infección de HSV2 con *C. trachomatis*, induce la persistencia de ésta última (Vanover et al. 2010); remarcando la importancia de la detección de estas infecciones y el tratamiento anti bacteriano adecuado en el paciente.

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello que incluyen la cavidad oral, la faringe y la laringe, han sido diagnosticados históricamente en personas mayores con antecedentes de consumo de tabaco y / o consumo excesivo de alcohol (Burd 2016). En nuestro estudio no encontramos asociación significativa entre el consumo de tabaco y alcohol y el tipo de lesiones. Las limitaciones que se presentaron en este trabajo están

---

relacionadas con la falta de datos acerca del consumo de tabaco y alcohol de todos los pacientes estudiados.

Sin embargo, existe cierta asociación entre el hábito de fumar y la prevalencia de infección oral por HPV, pero lo que es más importante, el consumo de tabaco se ha asociado con una capacidad reducida para la eliminación de la infección oncogénica por HPV. Aunque el vínculo biológico responsable del aumento de la prevalencia del HPV oral en los fumadores actuales todavía no se ha definido por completo, la razón radica en el medio local proinflamatorio de la mucosa oral / orofaríngea y la supresión inmunológica inducida por el uso del tabaco, lo que crea un nicho favorable para la infección y persistencia del HPV así como de otras ITS (Wood et al. 2019). En este trabajo en particular, no encontramos asociación estadísticamente significativa entre la presencia de los patógenos estudiados y el consumo de tabaco y alcohol. Se debe tener en cuenta también que dicho análisis estuvo acotado a los datos recabados de 85 pacientes, de quienes se pudo obtener información acerca del consumo de estos factores de riesgo.

El carcinoma de células escamosas orales y orofaríngeo es el sexto cáncer más común y también la sexta causa más grande de muertes relacionadas con el cáncer a nivel mundial. El 50% de los pacientes diagnosticados con OSCC tienen una tasa de supervivencia media de aproximadamente 5 años. Si bien la incidencia de los carcinomas de células escamosas en la cabeza y el cuello está disminuyendo, la incidencia de OSCC relacionada con HPV ha aumentado en los últimos años. Esto implica que pueden estar en juego diferentes mecanismos etiológicos apoyando el postulado de que el OSCC asociado a HPV es una entidad clínica distinta y separada del OSCC asociado al tabaco y al alcohol (Wood et al. 2019).

Es importante destacar, además, que los cánceres de cabeza y cuello positivos para HPV difieren notablemente de los negativos en su respuesta clínica y propiedades moleculares. Los carcinomas positivos para HPV tienen una mejor supervivencia general que los negativos para dicha infección viral, esto se debe a que los OSCC positivos para HPV albergan el p53 de tipo salvaje, mientras que los cánceres clásicos inducidos por el tabaco y el alcohol han mutado el p53 (Rautava et al. 2012).

Por otro lado, la pregunta clave actual es si las vacunas contra el HPV también previenen las infecciones en la región de cabeza y cuello. Por ahora se sabe que la vacuna contra el HPV induce anticuerpos específicos contra el virus en la saliva, incluido los anticuerpos neutralizantes. Dado que los anticuerpos contra el HPV se pueden detectar en la saliva, lo más probable es que sean efectivos para prevenir las enfermedades y/o lesiones de la cabeza y el cuello inducidas por la infección viral. De todos modos, son necesarios estudios de cohortes a largo plazo, para determinar la efectividad de la vacuna frente a estas infecciones en la cavidad bucal y orofaríngea (Syrjanen 2018).

Finalmente, en este estudio se detectaron los tres agentes estudiados en todos los tipos de lesiones orales e independientemente del sexo y la edad de los pacientes; por lo que consideramos que deberían tenerse en cuenta para fines de diagnóstico y tratamiento, y debe considerarse además su importancia epidemiológica.

Este trabajo es la primera contribución a la identificación y caracterización del genotipo del HPV y co- infección con otros agentes patógenos, en un escenario poco estudiado en nuestra área como lo es la cavidad bucal contribuyendo a mejorar nuestra comprensión sobre los agentes infecciosos de transmisión sexual y sus asociaciones en las lesiones orales.

### **1.2 Carga viral de los oncogenes E6 y E7 en lesiones orales HPV16**

El factor principal para desarrollar cáncer cervical (CC) radica en la infección persistente por al menos un tipo viral de HPV de alto riesgo (Del Rio-Ospina et al. 2015). Los genotipos 16 y 18 son genotipos de alto riesgo que están asociados con el 70% de los casos de cáncer cervical y otra proporción de cánceres asociados con HPV, como vulva, vagina, pene, ano y orofaringe (de Sanjose et al. 2010, Forman et al. 2012). Por ser el genotipo 16 el más frecuente a nivel mundial, la mayor parte del conocimiento sobre la relación entre la variante, la carga viral y el cáncer se ha basado en este tipo viral. Hay factores moleculares relacionados con el HPV16 que podrían modular específicamente esta asociación; entre ellos, se destaca la variabilidad genética dentro del mismo genotipo viral (Sichero et al. 2012, Cornet et al. 2013) y la carga viral del HPV (Saunier et al. 2008, Del Rio-Ospina et al. 2015).

---

La determinación de la carga viral se convirtió en un desafío metodológico porque se ha sugerido que el alto número de copias se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar lesiones asociadas a HPV. La cuantificación del ADN de HPV en la muestra biológica se puede lograr mediante métodos basados en PCR o mediante la prueba de HC2 (captura e hibridación) de forma cuantitativa o semicuantitativa, respectivamente. Las estimaciones del número de copias virales dependen directamente del número total de células y, en última instancia, de la cantidad de ADN viral. Por lo tanto, el ajuste del número de células de la muestra sería un requisito absoluto que no siempre se cumple, como es el caso de HC2 y algunos protocolos basados en PCR (Sherman et al. 2002, Sun et al. 2002).

Estudios previos de otros autores se interesaron en determinar la asociación entre la carga viral y la persistencia de la infección (Plummer et al. 2007, Ramanakumar et al. 2010); así como la relación entre la carga viral y la severidad, la progresión y el desarrollo de las lesiones (Saunier et al. 2008, Xi et al. 2011). Los resultados de algunas de estas publicaciones muestran que la cantidad de ADN viral aumenta proporcionalmente a la gravedad de las lesiones y es detectable incluso antes del desarrollo de las mismas; sin embargo, otros estudios no mostraron tal asociación (Andersson et al. 2005, Del Rio-Ospina et al. 2015). Nuestros resultados coinciden con estos últimos informes en los cuales no se halló una relación respecto de la carga viral de los oncogenes E6 y E7 del HPV16 y el tipo de lesiones que presentó el paciente al momento de la toma de muestra.

A su vez, también coincidimos con los resultados observados por Faust et al, que detectan una gran variación, de hasta  $10^5$  veces para la carga de ADN viral del HPV16 en diferentes muestras (Faust et al. 2016). Al igual que en estos datos descriptos anteriormente, en nuestros resultados pudimos observar una amplia variación en cuanto al número de copias de E6 del HPV16 por reacción entre, por ejemplo, las muestras número 9 y 11, en las cuales se detectan poco menos de 1000 y 10 copias de E6, respectivamente (ambas coincidentes en que se trataron de pacientes de sexo masculino, con hábitos de consumo de tabaco y alcohol, cáncer oral, co- infección de HPV AR y BR, negativos para *C. trachomatis* y HSV).

En referencia al amplio rango de carga viral que detectamos en cada uno de los pacientes estudiados, como dato adicional también destacamos cada uno de los genes

---

estudiados, no necesariamente están en cantidades similares en las mismas muestras. Como bien fue descrito por otros autores, si bien, la actividad transformadora de E7 aumenta considerablemente cuando E6 se coexpresa, la focalización concomitante de p53 y pRb por las oncoproteínas virales podría proporcionar una explicación para esta cooperatividad funcional. Específicamente, las señales proliferativas anormales, como las que ejercen los oncogenes activados, pueden provocar la inducción de apoptosis o senescencia mediada por p53, protegiendo así a los organismos multicelulares contra la aparición de células desreguladas del crecimiento. Los HPV oncogénicos podrían permitir que las células escapen de este mecanismo de defensa antitumoral, ya que el estímulo de crecimiento anormal resultante de la inactivación de pRb mediada por E7 no puede ser contrarrestado por p53, que se degrada a través de E6. En línea con este modelo, E7, cuando se expresa solo, induce p53 y tiene potencial proapoptótico, mientras que la inhibición específica de E6 (en presencia de expresión continua de E7) está relacionada con la inducción de apoptosis en las células de cáncer cervical (Hoppe-Seyler et al. 2018).

Sin embargo, este escenario ha sido cuestionado por un estudio de biopsias de pacientes, que informa que la integración del HPV no está necesariamente relacionada con una mayor expresión de E6 / E7. En la minoría de los cánceres positivos para el HPV que contienen exclusivamente ADN viral episomal (con genes E2 intactos), la represión de E6 / E7 mediada por E2 podría aliviarse mediante mecanismos alternativos, por ejemplo, bloqueando el acceso de la proteína E2 a la LCR viral mediante metilación de los sitios de unión a E2. Estos últimos informes podrían explicar además por qué hemos detectado en este trabajo, muestras OSCC con baja carga viral de los oncogenes, ya que desconocemos si las lesiones contenían HPV episomal o integrado (Chaiwongkot et al. 2013). Además, es posible que la baja carga de ADN viral de HPV16 en tumores orofaríngeos represente lesiones sin etiología viral (Faust et al. 2016). También se han informado grandes variaciones en la carga de ADN viral del HPV16 entre las muestras de OSCC en varios otros estudios (Koskinen et al. 2003, Badaracco et al. 2007, Holzinger et al. 2012, Deng et al. 2013).

Por otro lado, las investigaciones que utilizan una amplia gama de diseños, ensayos de laboratorio y métodos analíticos han sugerido que mayores cargas virales, especialmente

---

para el HPV16, particularmente en lesiones cervicales, pueden estar asociadas con la prevalencia de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o 3 (CIN2 o CIN3) (Bavin et al. 1993, Cuzick et al. 1994, Swan et al. 1999) o con la progresión de la infección por HPV a CIN3 (Josefsson et al. 2000, Ylitalo et al. 2000). No obstante, se ha debatido la utilidad clínica de medir la carga viral; en estudios de prevalencia, los valores de carga viral más altos se asociaron con enfermedad confirmada histopatológicamente, pero los valores se superpusieron considerablemente entre los grados de CIN y no aumentaron con la gravedad de la enfermedad. En otro análisis que corrigió las mediciones de carga de los tipos de HPV16, 18, 31 y 45 (Swan et al. 1999), solo la carga de HPV16 se asoció con la gravedad de la enfermedad, y los autores concluyeron que el amplio rango de valores limitaba la utilidad clínica. Se sugiere entonces que la carga viral medida en este último estudio en realidad puede disminuir con el grado de lesión, pero la gran superposición de valores obtenidos descartaría el uso clínico (Sherman et al. 2002).

De esta manera, los estudios sobre la correlación positiva entre la carga viral del HPV16 y el cáncer cervical u orofaríngeo son controvertidos (Andersson et al. 2005, Beachler et al. 2015). Estudios previos (Cerasuolo et al. 2017) encontraron que la carga viral de HPV16 era ampliamente variable, especialmente en el cáncer cervical con un número de copias virales significativamente mayor que en los tejidos cervicales no tumorales. En orofaringe encontraron una carga viral ligeramente mayor en los tejidos no tumorales que en las muestras de carcinoma oral. Datos similares se pueden observar en nuestros resultados, en los cuales se obtuvo la segunda carga viral más alta para E6 en una lesión benigna, en co- infección con *C. trachomatis*, con lo cual podemos pensar que la infección bacteriana presente, podría estar ejerciendo un rol sinérgico para este tipo de lesiones. Un estudio reciente de Dang y Feng (2016) mostró que las muestras de cáncer oral y orofaríngeo contenían una mayor carga de ADN de HPV16 que los tejidos normales de pacientes (Dang and Feng 2016).

Otros estudios mostraron que el patrón de expresión génica del HPV podría ser útil como marcador molecular viral de la progresión tumoral (Schmitt et al. 2010, Holzinger et al. 2012, Hofler et al. 2015). El análisis de los niveles de ARNm E6 y E7, junto con otros datos clínicos, parece útil para evaluar el riesgo de progresión de los casos de cáncer

cervical y orofaríngeo (Woodman et al. 2007, Chaturvedi et al. 2011). Los resultados de un estudio realizado por Cerasuolo et al, mostraron que la expresión de E6 y E7 en el carcinoma orofaríngeo y tejidos no tumorales fue mucho menor que en las muestras de cáncer cervical. Estos resultados son consistentes con estudios previos que informan que, si bien el HPV siempre es transcripcionalmente activo en el carcinoma cervical, los oncogenes virales pueden no expresarse en el cáncer orofaríngeo positivo para HPV16, lo que sugiere que el virus en algunos cánceres de cabeza y cuello, no es el principal factor cancerígeno (Chaturvedi et al. 2011, Ndiaye et al. 2014, Cerasuolo et al. 2017). Si bien en este trabajo no estudiamos específicamente expresión de los oncogenes, sino, carga viral, también podríamos pensar, teniendo en cuenta los estudios descriptos anteriormente, que en los casos de OSCC, no sería el HPV el factor desencadenante de dicha lesión maligna. Los pacientes con carcinoma orofaríngeo sin HPV biológicamente activo se consideran en riesgo de progresión de cáncer de manera similar a los pacientes fumadores con HPV negativos (Ndiaye et al. 2014, Tornesello et al. 2014).

Curiosamente, en la displasia orofaríngea, un estudio detectó el oncogén E7 y la isoforma E6 \* I; lo que lleva a la hipótesis de que la actividad oncogénica del HPV puede ser importante para las fases tempranas de la neoplasia orofaríngea. Se ha sugerido que durante las primeras etapas de la carcinogénesis orofaríngea, las oncoproteínas virales pueden sinergizar con otros carcinógenos, como el humo del tabaco y el alcohol, y pueden aumentar el riesgo de progresión tumoral (Gillison et al. 2000, Cerasuolo et al. 2017). Sin embargo, en nuestros resultados no se observaron diferencias en cuanto a la carga viral detectada y los factores de riesgo convencionales como tabaco y alcohol. Se debe destacar, además, como una limitante de nuestro estudio, que no contamos con el seguimiento de la evolución de las lesiones, sino que estos resultados son producto del estudio transversal de una muestra del paciente al momento de la consulta odontológica. Por lo cual, se desconoce el estadio del desarrollo de la lesión oral, lo que podría ser útil para evaluar si se correlaciona con la alta o baja carga viral detectada.

En conclusión, se requerirían estudios de seguimiento a largo plazo para investigar el impacto de la carga de ADN del HPV16 y el estado físico viral en el resultado clínico de pacientes con lesiones positivas para HPV.

### 1.3 Mutaciones puntuales asociadas a la malignidad

A lo largo de los años se han realizado una gran cantidad de experimentos para estudiar las mutaciones de una variedad de HPV de alto riesgo, que se concentran principalmente en HPV 16, 18, 33, 35 y 45. Sin embargo, el HPV16 es el principal factor patógeno en la aparición de cáncer cervical y, por lo tanto, la mayoría de los informes están relacionados con la variación del HPV16. Las mutaciones del virus pueden conducir a la sustitución de aminoácidos en las proteínas codificadas correspondientes, lo que puede alterar las características biológicas e inmunogenicidad viral y afectar la capacidad carcinogénica del HPV16. Cada estudio de variación genética en el HPV16 ha demostrado que una mutación particular del locus genético permitirá que el virus escape más fácilmente de la vigilancia del sistema inmunitario del hospedador o aumente la posibilidad de infección viral generando una transformación maligna (Zhe et al. 2019).

Un papel para HPV en la progresión del cáncer oral es más plausible si los genes de transformación viral se sobreexpresan en células cancerosas orales. El rol fundamental de estos virus en la etiología del cáncer es la producción de las oncoproteínas E6 y E7. Estos oncogenes se transcriben a niveles altos en tejido tumoral y en líneas celulares derivadas de tumores y también se requieren para el mantenimiento del fenotipo transformado (O'Connor et al. 1996).

En relación a lo anterior, la proteína E1 promueve la replicación del genoma viral y la proteína E2 está correlacionada negativamente con la expresión del oncogén. La integración y mutación de E1 y E2 pueden promover la expresión de los genes E6 y E7, lo que lleva a la aparición y desarrollo de cáncer cervical. E7 es una oncoproteína con alto riesgo carcinogénico que contiene 98 aminoácidos, lo que hace que las células epiteliales sean inmortales con la cooperación de la proteína E6. Muchos investigadores han secuenciado los genes de HPV16 aislados de lesiones cervicales. Se ha encontrado que la variación de la E6 del HPV16 está correlacionada con la progresión de las lesiones cervicales y que las variantes de HPV16 y las mutaciones de la E6 del HPV16 varían según el área racial y geográfica (Zhe et al. 2019).

Una de las mutaciones más frecuentes en la E6 es la variación T350G, la cual produce una sustitución de aminoácidos leucina por valina, denominado L83V (Zuna et al. 2011). El

---

aminoácido 83 de la oncoproteína E6 está rodeado por aminoácidos altamente conservados S-L83V-YG, común en todos los HPV anogenitales de alto riesgo, pero difieren en los tipos de bajo riesgo (Andersson et al. 2000).

Las variaciones de la secuencia del gen HPV16 pueden aumentar la virulencia del virus y mediar en el escape inmune, siendo de esta manera factores de riesgo para la progresión del cáncer. Sin embargo, diferentes estudios muestran resultados inconsistentes, que pueden estar relacionados con diferencias en el perfil genético de las poblaciones infectadas (Zhe et al. 2019).

Mutaciones en los genes codificantes podrían generar cambios en la composición de aminoácidos, lo cual puede traducirse en alteraciones de la estructura terciaria de las proteínas e influir en su función; estudios “*in vitro*” de diferentes variantes de HPV16 han demostrado diferencias en la actividad biológica de las proteínas (Zehbe et al. 2009, Zuna et al. 2011).

Se informó que el cambio en el codón 83 del gen E6, estaría asociado a la progresión de neoplasia intraepitelial de bajo grado (LSIL) a neoplasia de alto grado (HSIL). Si bien son escasos los estudios del análisis del polimorfismo de la E6 del HPV16 en diferentes cohortes poblacionales, se sostiene que el potencial oncogénico de L83V estaría relacionado con las diferencias genéticas existentes entre las distintas poblaciones. Así, Zehbe informó que los polimorfismos de HPV16 E6 en lesiones cervicales varía en las diferentes cohortes europeas, sugiriendo una estrecha relación entre las variantes de E6 y los haplotipos HLA II (Zehbe et al. 2001). Sin embargo, se trata de la mutación puntual más frecuente en la región E6, descrita por muchas otras investigaciones en diferentes partes del mundo (Brady et al. 1999, Andersson et al. 2000, Kammer et al. 2002, Sichero et al. 2012). A su vez, más importante aún para remarcar, la región E6 es una región codificante, es decir que su secuencia nucleotídica se traduce a proteínas. Esta mutación, se sabe que también afecta a la codificación de aminoácidos, y debido a que la proteína E6 tiene capacidad transformante, esta actividad se vería afectada por cambios aminoacídicos en sitios funcionales (Andersson et al. 2000). En este trabajo también se detectó a esta mutación en la mayor parte de las muestras analizadas, independientemente del tipo de lesión que presentaban. Nuestros resultados, además de estar en concordancia con los datos

---

publicados por otros autores, también coinciden con un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, en el cual también se detectó la mutación T350G como la más frecuente en la región E6, en diferentes grados de lesiones cervicales (Mosmann et al. 2015).

Además, la expresión de los genes virales es un proceso complejo que incluye factores de transcripción virales y celulares, los cuales tienen efectos estimuladores y represores (Chan et al. 1995, O'Connor et al. 1995). Las deleciones o mutaciones puntuales indican que la actividad del promotor es dependiente de muchos factores. Los cambios nucleotídicos pueden abolir la capacidad de unión de un factor de transcripción o cambiar su afinidad por un determinado sitio o su habilidad para interactuar con otras proteínas. El efecto depende de si el cambio está dentro del sitio de unión o cercano a él (Zhe et al. 2019).

La transcripción de oncogenes E6 y E7 del HPV16 se controla mediante un solo promotor, denominado P97, que a su vez está modulado por elementos reguladores dentro de la región LCR. El gen LCR es la región más variable del genoma de HPV16 y puede ejercer una función vital en la infección por virus persistente y la progresión de la lesión al del cáncer. La mayoría de los sitios de unión al factor de transcripción están presentes dentro del segmento central de la LCR, entre dos elementos E2. Los factores celulares que previamente se identificaron y que se ha demostrado que regulan una serie de HPV incluyen NFI, AP-1, SP1, Oct-1, TEF-1 e YY1. La proteína viral E2 también es un importante modulador de la actividad del promotor E6-E7 (O'Connor et al. 1996, Zhe et al. 2019).

Se conocen también una serie de mutaciones puntuales en la región LCR aisladas a partir de células cancerosas orales y células epiteliales orales inmortalizadas con HPV. La actividad promotora de las LCR mutadas es significativamente mayor que la de las LCR de tipo salvaje equivalentes en células de cáncer oral que contienen el mismo tipo de HPV. Esto implica que las mutaciones en LCR de los HPV en el cáncer oral podrían conducir a un aumento de la expresión de las proteínas transformadoras del HPV, contribuyendo de esta manera al proceso carcinogénico (Nair and Pillai 2005).

Se ha informado que las células epiteliales indiferenciadas contienen un exceso de los factores de transcripción celular YY1 y CDP y así controlarían la transcripción del HPV.

Las concentraciones de YY1 y CDP disminuyen durante la diferenciación mientras la concentración del activador AP-1 aumenta (Kalantari and Bernard 2006). El factor de transcripción YY1 es una proteína de dedos de zinc que fue originalmente denominada “Ying y Yang 1”. En el HPV16 se sugiere que la unión de YY1 a ciertos sitios del potenciador puede reprimir la expresión de los genes del HPV pero naturalmente se producen deleciones o mutaciones puntuales de estos sitios dentro del genoma del virus, dando lugar a niveles elevados de la actividad del promotor, pudiendo contribuir a la oncogénesis (O'Connor et al. 1996).

También se conoce que las diferencias en las secuencias del gen LCR de HPV16 fueron atribuidas a diferencias funcionales en las tasas de replicación y actividad transcripcional del promotor E6, comparadas con el prototipo (Bernard et al. 2006) y que las variaciones intratípicas en el gen E6 parecen influenciar la actividad oncogénica del virus afectando la persistencia viral y la progresión de la enfermedad (Cento et al. 2009).

En la región LCR, la posición 7521 es particularmente donde se encuentra el sitio de unión del factor de transcripción YY1, regulador de la transcripción de los oncogenes virales, de manera que los cambios en la transcripción o mutaciones en los sitios de unión de YY1 podrían resultar en niveles elevados de la expresión de los genes de HPV, más específicamente de los oncogenes E6 y E7, por lo que demostraría la importancia clínica de dicha mutación (O'Connor et al. 1996).

El análisis de los cambios nucleotídicos encontrados en pacientes con cáncer y asintomáticos muestran que los primeros se adaptan a cambios preferencialmente dentro o cerca del sitio de unión YY1 mientras que los otros, a una amplia variedad de sitios de unión de los factores de transcripción (Schmidt et al. 2001).

Esta mutación puntual en la región LCR, posición nucleotídica 7521, descrita por su posible asociación con la progresión al cáncer, fue detectada en la mayoría de las muestras estudiadas en este trabajo, en concordancia con trabajos realizados por otros autores en los cuales describen a esta mutación como la más frecuente de la región LCR (Yamada et al. 1997, Kammer et al. 2002, Pande et al. 2008). La misma se encontró en los diferentes tipos de lesiones orales analizadas, por lo cual es importante destacar la relevancia que puede tener este tipo de mutaciones, particularmente en las lesiones benignas o potencialmente

malignas. Al igual que en el caso de la región E6, esta mutación puntual fue detectada en un estudio previo como la más frecuente de la región LCR en muestras de lesiones cervicales (Mosmann et al. 2015).

Ambas mutaciones puntuales estudiadas, tanto en la región E6 como en LCR, fueron encontradas en lesiones B, PMOD y OSCC; atendiendo a la importancia de estudiar y poder seguir en el tiempo la evolución principalmente las lesiones PMOD, las cuales tienen mayor predisposición a la malignización por si solas y potenciadas por la presencia de dichas mutaciones. Es necesario a su vez profundizar en el análisis de mutaciones asociadas con la carcinogénesis, tanto en el oncogén E6 como en la región no codificante LCR, ya que en ambos casos hemos detectado en las muestras secuenciadas, las mutaciones más frecuentes descritas para cada gen, asociadas a un posible desarrollo de malignidad.

## **2. Estudios *in vitro***

### **2.1 Marcadores celulares, virales y mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis**

Algunos genotipos de HPV, en particular el 16 y 18, están íntimamente asociados con el desarrollo del cáncer cervical, particularmente sus oncoproteínas E6 y E7, las cuales se expresan continuamente en tumores cervicales y líneas celulares derivadas de ellos (Mantovani and Banks 1999).

La progresión al cáncer asociado a las infecciones por HPV, se han relacionado con un aumento en la expresión de los oncogenes virales (Sotlar et al. 2004, Fontecha et al. 2016). En los HPV oncogénicos, los genes E6 y E7 se transcriben como transcripciones policistrónicas de un promotor común ubicado en la región no codificante LCR, por lo tanto, el nivel de expresión de E6 y de E7 está regulada por numerosos factores de transcripción celular que se unen a LCR, con AP1 y SP1 como activadores transcripcionales claves (Bernard 2013). En particular, la proteína E2 de HPV puede bloquear eficazmente la transcripción de los oncogenes virales al unirse a sitios de reconocimiento cercanos al promotor de E6 y de E7. Durante el proceso de transformación

celular, los HPV oncogénicos pueden evadir esta regulación negativa. Específicamente, en más del 80% de los cánceres cervicales, el ADN de HPV se integra en los cromosomas del hospedador (McBride and Warburton 2017), un evento que comúnmente conduce a la eliminación de una región del gen viral E2 y, por lo tanto, al aumento de la expresión de E6 y de E7 debido al escape de inhibición transcripcional mediada por E2 (Hoppe-Seyler et al. 2018).

Las proteínas E6 y E7 son proteínas virales de fase temprana, que estimulan el ciclo de vida del virus a través de la manipulación de las funciones celulares y son esenciales para deformar la célula hospedadora; estas proteínas también desregulan la red celular de ARNm asociada con muchos tipos de cáncer. La oncoproteína E7 es una proteína pequeña con aproximadamente 100 aminoácidos, que interactúa con proteínas celulares como retinoblastoma (pRB), una proteína celular importante que interactúa con la oncoproteína viral E7, y que normalmente se expresa en muchos tejidos y desempeña un papel principal en la supresión del tumor. En las infecciones por HPV, la proteína E7 se une a pRB y da como resultado la descomposición y desactivación de la función de esta última activando la ubiquitina ligasa, lo que conduce a la progresión maligna más allá del control del ciclo celular. La proteína E7 del HPV16 también se puede unir directamente a E2F, un factor importante en el ciclo celular que juega un papel central en el movimiento de las células de la fase G1 a la fase S. A su vez, la proteína E7 está involucrada en diversas actividades de factores de transcripción celular como AP1, entre otros (Taghizadeh et al. 2019).

Una consecuencia importante de la unión eficiente de pRB-E2F y otros reguladores del ciclo celular con las proteínas E7 de HPV de alto riesgo es un aumento en los niveles del supresor tumoral p53. La actividad oncogénica de los virus que causan cáncer depende en gran medida de la capacidad viral para inactivar p53 (Issaeva 2019). Para contrarrestar esto, las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo utilizan varios mecanismos para interferir con las funciones de p53. Las proteínas E6 reclutan la proteína E3 ubiquitina ligasa asociada a E6 (E6AP), que conduce a la ubiquitinización y degradación proteasómica de p53. Las proteínas E6 también pueden unirse directamente a p53 y bloquear la transcripción al interferir con su actividad de unión al ADN. Las proteínas E6 de bajo riesgo también pueden asociarse con E6AP, pero sorprendentemente esto no da lugar a la degradación de

---

p53, lo que sugiere que otros factores celulares son objetivos para el complejo E6 – E6AP de bajo riesgo (Moody and Laimins 2010).

Los HPV de bajo riesgo no tienen intrones dentro de sus ORF E6 y sólo expresan una única proteína E6. Por el contrario, el HPV16 y el HPV18 pueden expresar una proteína E6 de longitud completa (E6) o proteínas E truncadas (E6 \*) denominadas E6 \* I y E6 \* II, mediante un empalme alternativo dentro del ORF E6. La proteína E6 de los HPV de alto riesgo puede unirse a varios objetivos celulares, lo que conduce a la interferencia con la transcripción, la remodelación de la cromatina, la señalización de citocinas, la degradación de proteínas, modificación de la polaridad celular y la apoptosis, desencadenando la inestabilidad genómica de la célula (Ghittoni et al. 2010, Rautava et al. 2012).

La degradación de p53 por el complejo E6-E6AP reduce los niveles netos de p53, pero el p53 restante puede activarse en respuesta al daño del ADN y otras tensiones celulares. La proteína E6 también interfiere con la función de p53 al unirse a las dos histonas acetiltransferasas relacionadas, p300 y la proteína de unión a CREB (CBP), bloqueando la capacidad de estos factores para acetilar p53 y, por lo tanto, aumentar su estabilidad (Patel et al. 1999, Zimmermann et al. 1999). Las proteínas E6 de HPV de bajo riesgo también inhiben la actividad transcripcional de p53 a través de la unión directa (Lechner and Laimins 1994) y este puede ser el mecanismo predominante por el cual los HPV de bajo riesgo inhiben los efectos supresores del crecimiento de p53. La razón principal por la cual las proteínas E6 de alto riesgo bloquean la función de p53 es facilitar la replicación viral productiva, pero esto a su vez tiene consecuencias para el desarrollo del tumor. Como las infecciones por HPV persisten durante períodos prolongados, la anulación de la función p53 permite que se acumulen mutaciones genéticas que normalmente se habrían reparado. Curiosamente, E6 no se une ni promueve la degradación de los homólogos de p53, p73 y p63, lo que indica que la inactivación de estas proteínas no es necesaria para la transformación (Roth and Dobbstein 1999).

Aunque los efectos del E6 de alto riesgo en p53 son centrales para el desarrollo de cánceres, los objetivos independientes de p53 adicionales juegan partes igualmente importantes. Los mutantes E6 deficientes para la degradación de p53 aún pueden inmortalizar las células (Liu et al. 1999), lo que sugiere que las interacciones con otros

---

factores celulares son necesarias para el desarrollo del cáncer. Entre los objetivos importantes independientes de p53 están las proteínas PDZ que se asocian solo con proteínas E6 de alto riesgo (Thomas et al. 2008). La mutación del dominio de unión a PDZ de E6 en el contexto de genomas virales completos conduce a tasas de crecimiento reducidas, pérdida de episomas virales e integración frecuente de los genomas virales en los cromosomas del hospedador, lo que indica la importancia de estas interacciones para la patogenicidad viral (Lee et al. 2007).

En ensayos de sobreexpresión transitoria, también se ha demostrado que E6 se une a una serie de otros factores que también pueden contribuir a la transformación. Entre estos se encuentran la proteína de unión a E6 (E6BP), proteína de unión a calcio que se encuentra en el retículo endoplásmico; proteína 1 dirigida a E6 (E6TP1, también conocida como proteína 1 similar a SIPA1), una proteína activadora de GTPasa; y mantenimiento de minicromosomas 7 (MCM7), un regulador de la replicación (Howie et al. 2009). Sin embargo, no está claro cuáles de estas actividades E6 son importantes *in vivo* (Moody and Laimins 2010).

Por otro lado, las mutaciones en el gen supresor de tumores p53 son los cambios genéticos específicos más comunes en los tumores humanos. Sin embargo, ocurren raramente en tumores en los que p53 puede inactivarse por interacción con proteínas celulares o virales. Por ejemplo, en el cáncer cervical, la mutación de p53 es poco frecuente, pero el HPV está presente en más del 90% de los tumores. La correlación de la infección por HPV y la mutación de p53 se ha estudiado de cerca en el cáncer de cuello uterino y, debido a que la proteína E6 del virus desactiva la p53, las mutaciones del mismo se limitarían a los casos negativos al HPV (Park et al. 1994, zur Hausen 1996).

Diferentes señales de estrés, como daño en el ADN, hipoxia, choque térmico y activación de oncogenes inducen un aumento en la estabilidad de la proteína p53 de tipo salvaje. La acumulación de p53 se asocia con la transcripción de una serie de genes celulares que responden a p53 y que median la inducción de la detención del crecimiento y la apoptosis de p53 (Bates and Vousden 1999).

La proteína p53 activada también induce la transcripción de Mdm2- Hdm2, que puede interactuar directamente con el dominio de activación de p53, inhibiendo su actividad de

transcripción y dirigiéndola a la degradación. Por lo tanto, la estabilidad de p53 mutante observada se puede explicar por su incapacidad para inducir la síntesis de Mdm2- Hdm2 (Hietanen et al. 2000)

Cabe destacar que las líneas celulares utilizadas en este trabajo, HeLa y CaSki expresan p53 de tipo salvaje, y C33A expresa p53 mutado (Yaginuma and Westphal 1991). Al menos en algunas líneas celulares de carcinoma cervical, la expresión continua de E6-E7 parece ser necesaria para el mantenimiento del estado maligno. Por lo tanto, el aumento de p53 podría restablecer la función supresora de tumores del mismo, en células de carcinoma cervical (Hietanen et al. 2000).

La regulación de la función de p53 está estrechamente controlada a través de varios mecanismos que incluyen la transcripción y traducción de p53, la estabilidad de la proteína y las modificaciones postraduccionales (Rodriguez et al. 1999). La importancia de la localización celular de p53 para su función ha cobrado impulso en los últimos años. Por ejemplo, la reubicación de p53 al núcleo después del estrés celular es deseable para inhibir el crecimiento de células malignas. Además, en varios tipos de tumores que retienen p53 de tipo salvaje, la pérdida de actividad de p53 se asocia con una ubicación citoplasmática de la misma, como bien se ha observado en las inmunofluorescencias realizadas en esta tesis, particularmente para las líneas celulares CaSki y HeLa. En tales casos, p53 se excluye del núcleo como resultado del secuestro citoplasmático o exportación nuclear hiperactiva. Los tipos de tumor con confinamiento citoplasmático de p53 responden menos al estrés genotóxico inducido por radioterapia o quimioterapia; mientras que la acumulación citoplasmática de p53 es un factor pronóstico desfavorable independiente en el cáncer (O'Brate and Giannakakou 2003). La regulación de la localización celular de p53 depende de factores que influyen en su importación y exportación nuclear, localización subnuclear, y fijación y secuestro citoplasmático. La función de p53 depende de su localización nuclear y tanto la importación nuclear como la exportación nuclear de p53 están estrictamente reguladas (Ryan et al. 2001). La importación nuclear de p53 está habilitada por sus tres señales de localización nuclear (NLS) mientras que la exportación nuclear está habilitada por sus dos señales de exportación nuclear (NES) (Zhang and Xiong 2001). Cuando se produce daño en el ADN, la p53 se importa al núcleo a través de su NLS y se somete a una

---

tetramerización, se une y activa los genes de respuesta al daño del ADN, junto con MDM2. Hay varias proteínas que influyen en p53 importación y exportación nuclear, una de las más importantes es MDM2 (O'Brate and Giannakakou 2003).

MDM2 es un regulador negativo de p53, que promueve su degradación por su función de ubiquitina ligasa E3 e inhibe finalmente la actividad transcripcional de p53. Como MDM2 es un objetivo transcripcional de p53, se genera un circuito de retroalimentación autorreguladora en el que la actividad de p53 conduce a una mayor expresión de su propio regulador negativo (Kubbutat et al. 1997). Cuando se induce p53, transactiva MDM2, que a su vez se une, a ubiquitina y se dirige a p53 para la degradación. La activación y estabilización de p53 van de la mano con la inhibición de la función de ubiquitina ligasa de MDM2 (O'Brate and Giannakakou 2003).

Tanto MDM2 como p53 se mueven entre el núcleo y el citoplasma de la célula. Tras la activación, se localizan en el núcleo donde activan los genes diana, pero también deben volver a ingresar al citoplasma por varias razones: la degradación de p53 y MDM2 ocurre principalmente en el citoplasma, mientras que p53 debe salir del núcleo para detener su función de activación y permitir que la célula continúe su curso elegido (detención del ciclo celular o apoptosis). Aunque la exportación nuclear de p53 dependiente de MDM2 es crítica para la función de p53, aún no está claro cómo ocurre (O'Brate and Giannakakou 2003).

Por lo tanto, en células normales en condiciones no estresadas, p53 es una proteína de corta duración que se desplaza entre el núcleo y el citoplasma de una manera específica en el ciclo celular (Hayon and Haupt 2002) y se mantiene en forma latente. Sin embargo, en respuesta al estrés, la localización de p53 está sesgada hacia la acumulación nuclear, que es esencial para que p53 produzca sus efectos biológicos; la interferencia con esta regulación es suficiente para inactivar p53. De hecho, la p53 de tipo salvaje se inactiva funcionalmente por secuestro citoplasmático y falta de respuesta al daño del ADN en muchos tipos de tumores, y la localización citoplasmática de p53 en tumores, se ha asociado con una pobre respuesta a la quimioterapia, metástasis tumoral y una pobre supervivencia del paciente a largo plazo (O'Brate and Giannakakou 2003).

---

Particularmente, en las células infectadas por HPV, MDM2 no es necesario para la degradación de p53 dependiente de E6, ya que se demostró que E6 promueve la degradación de p53 en células que carecen de MDM2 endógeno y la degradación completa de p53 por E6 requiere exportación nuclear y, por lo tanto, es probable que ocurra en proteosomas citoplasmáticos. Estos datos sugieren que la exportación nuclear de p53 al citoplasma para la degradación es un mecanismo general para regular los niveles de p53 en células infectadas por HPV. Nuestros resultados de inmunofluorescencia fueron coincidentes con estos datos; especialmente en la línea celular C33AE6E7, en la cual, además de mostrarse un aumento de la expresión de la oncoproteína E6 frente a diferentes infecciones, pudimos observar la exportación nuclear de p53 cuando fueron transfectadas con dicho oncogén, indicando la participación de E6 en la degradación citoplasmática de p53, como ocurre en las líneas celulares HeLa y CaSki. Si bien la línea celular C33A es de origen maligno (carcinoma cervical), se conoce que la introducción de los genes E6 y E7 de HPV de alto riesgo en células cultivadas normales perjudica el control del ciclo celular e induce inestabilidad genética, pero las proteínas virales no inducen directamente la tumorigénesis (DeFilippis et al. 2003).

La pérdida de la actividad supresora de tumores de p53, ya sea por mutación o por interacción con la proteína E6 de HPV se considera un mecanismo importante en la carcinogénesis del cáncer cervical. Un estudio previo, determinó además que tanto p53 como E6 tenían distribuciones citoplasmáticas similares en las líneas celulares infectadas con HPV, lo que implicaba que estas dos proteínas pueden existir como un complejo citoplasmático. Los resultados de este estudio respaldan la teoría de que la proteína p53 se une a la proteína E6 HPV16/18 en el citoplasma celular, evitando así que p53 ejerza su función supresora de tumores en el núcleo. Por lo tanto, la inactivación de p53 de tipo salvaje por la formación del complejo p53-E6 en el cáncer cervical puede ser un paso crítico en la transformación maligna, tal como vimos que ocurrió en nuestra línea celular C33AE6E7 (Liang et al. 1993).

En líneas celulares que carecen de E6, otros estudios demostraron que la inhibición del proteosoma junto con un tratamiento con un agente dañino del ADN, da como resultado una rápida localización nuclear de la proteína p53, tal como se observó en la línea celular

C33A, negativas para HPV. En contraste, en células que contienen proteína E6 tratada de manera similar, la mayoría de p53 se encuentra en una ubicación perinuclear (Mantovani and Banks 1999).

Sin embargo, la sola infección por HPV no siempre conduce a cambios histológicos y manifestaciones de enfermedad clínica, sino, que se sugiere que el desarrollo de enfermedad clínica con progresión a cáncer es probablemente multifactorial con varios co-factores involucrados. Los co-factores podrían incluir los ya conocidos tabaco y alcohol, y además la presencia de otras co-infecciones, particularmente otras ITS (Underbrink et al. 2008).

Debido a que agentes patógenos como HPV y *C. trachomatis* tienen la capacidad de infectar la mucosa cervical y ambos son de transmisión sexual, existe la posibilidad de que estos patógenos interactúen dentro del hospedador humano. Además, algunos datos clínicos sugieren que *C. trachomatis* se beneficia de la co-infección por HPV y / o acelera el desarrollo anormal de la citología o histología asociada a la infección por HPV (Karim et al. 2018). Se describieron al menos dos "vías" por las cuales la interacción *C. trachomatis* - HPV podría producir estos resultados. Primero, las interacciones moleculares entre el HPV y *C. trachomatis* dentro de la misma célula hospedadora podrían promover el desarrollo de *C. trachomatis*, evasión de las respuestas inmunes por *C. trachomatis* y / o neoplasia de células epiteliales. A medida que las células infectadas por HPV son impulsadas a proliferar y diferenciarse, *C. trachomatis* probablemente infecte una célula epitelial que ya contiene ADN del HPV episomal o integrado, así como E6 / E7 y otras proteínas virales. Dado que el HPV infecta inicialmente las células basales, parece menos probable la co-infección simultánea o la superinfección por HPV de una célula hospedadora en la que la infección por *C. trachomatis* ya fue establecida. Independientemente del orden de infección, la interacción del HPV con otros patógenos intracelulares dentro de la misma célula hospedadora puede alterar el resultado de la infección; sin embargo, hasta donde se conoce, no se han realizado estudios específicos de co-infección *C. trachomatis* / HPV para determinar los mecanismos implicados (Slade and Schoborg 2019).

Estudios previos demostraron además que la infección por *Chlamydia* también reduce la p53, por ejemplo, en las células HeLa. La disminución de la expresión de p53 es una

---

consecuencia general de la infección por *Chlamydia*, ya que también se observó en células infectadas con un serotipo de *C. trachomatis* diferente, la especie patógena humana *C. pneumoniae* y la cepa murina específica *C. muridarum* (Siegl et al. 2014). En cuanto a la intensidad de fluorescencia de la proteína p53, en nuestros resultados pudimos observar una disminución de la misma, frente a las infecciones por *C. trachomatis*, apoyando esta hipótesis de que *C. trachomatis* también es capaz de producir la degradación del gen supresor de tumores p53 (Yuan et al. 2012).

En referencia a las infecciones por HSV1, como bien se describió, aún no se conoce específicamente el rol de p53 frente a este agente patógeno. Al contrario de lo que ocurre con las infecciones por HPV y por *C. trachomatis*, algunos virus parecen requerir p53 para una replicación viral eficiente. Se ha informado, por ejemplo, que la eliminación de p53 puede afectar la replicación del CMV y del HSV1 (Maruzuru et al. 2013). Es decir, p53 promueve la expresión de HSV1 ICP27, un regulador esencial de la expresión de genes virales en las etapas tempranas de la infección, pero en las etapas posteriores, tiene el efecto opuesto en otro regulador crítico de la expresión de genes virales, HSV1 ICP0. Curiosamente, este efecto negativo de p53 en la expresión de ICP0 parece estar antagonizado por HSV1 ICP22. Estas observaciones sugieren que estos virus han desarrollado múltiples mecanismos para organizar con precisión los efectos positivos y negativos de p53 en las células infectadas (Maruzuru et al. 2016). En base a estos datos es que tiene sentido el hecho de no haber observado una marcada disminución de fluorescencia de p53 en nuestros experimentos, cuando las células fueron infectadas con HSV1.

En resumen, al analizar estos resultados podemos interpretar que E6 está degradando p53 activamente a nivel citoplasmático en las células infectadas persistentemente por HPV y que esta degradación es aún más marcada al estar presente la infección por *C. trachomatis*. Si bien, a través de estos experimentos de inmunofluorescencia no es posible cuantificar el aumento o disminución de la expresión de p53 frente a la infección por *C. trachomatis*, podemos deducir que frente a la infección bacteriana se ve potenciada la degradación p53, a través de la vía E6; al no observarse una disminución de la intensidad de fluorescencia de p53 en células C33A, carente del oncogén E6.

---

Por otro lado, algunos datos sugieren que la infección por *C. trachomatis* favorece la entrada y la persistencia de múltiples tipos de HPV-AR en el epitelio cervical. Esto a su vez podría conducir a la integración viral, a la inhibición de la apoptosis, a la sobreexpresión de los oncogenes E6 / E7 y eventualmente a la transformación celular. De la misma manera, tanto NF-kB como survivina parecen estar implicados en la inhibición de la apoptosis por la glicoproteína D de HSV, que podría ser uno de los mecanismos que median las acciones sinérgicas implicadas por el Virus Herpes y por los HPV-AR en la carcinogénesis (Paba et al. 2008).

El HSV1 ha sido sugerido como un factor de riesgo en el desarrollo de tumores malignos humanos y se ha demostrado una asociación entre el virus del herpes y los carcinomas de cabeza y cuello (Ahmed and Jafarey 1995). Ensayos en cultivos de células humanas han demostrado que HSV1 es mutagénico e inhibe la apoptosis (Hara et al. 1997). La persistencia viral en la cavidad oral y la capacidad del HSV para estimular la síntesis y reparación del ADN del hospedador durante la infección también se ha sugerido que contribuyen al desarrollo de cáncer oral. Hara et al. han demostrado que HSV1 y HSV2 pueden causar la amplificación de una línea celular de HPV, lo que indica la posibilidad de que el HSV se involucre en la integración y amplificación del HPV en la célula hospedadora (Parker et al. 2006).

En relación a estos datos, nuestros resultados mostraron que, en líneas generales, existió un sinergismo frente a las co- infecciones de HPV con *C. trachomatis* y HSV1. Como bien se describió en los resultados obtenidos, en relación a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, las mismas se vieron aumentadas en las líneas celulares persistentemente infectadas por HPV16 y 18 frente a la sola infección por *C. trachomatis*; y frente a la co- infección por *C. trachomatis* y por HSV1 juntos, particularmente a las 48 hpi. En resumen, para la línea celular CaSki se observó el efecto sinérgico de aumento tanto de E6 como de E7 frente a todos los agentes infecciosos; en C33AE6E7 se observó aumento en E6, no así en E7, y en células HeLa mostró más fuerza en este efecto sinérgico frente a HPV. En esta última se observó, además, que ante la infección por HSV1, se produjo una disminución de la expresión de los oncogenes. Este último resultado concuerda con otro publicado anteriormente por Karlen et al; en el cual informaron que la infección

---

por HSV1 modifica fuertemente la expresión endógena de los genes de HPV18 en las células HeLa y luego de unas pocas horas los niveles de ARNm de HPV se reducen considerablemente, tanto los ARNm de HPV18 como de GAPDH, en la misma medida. Un componente asociado al virión es probablemente el responsable de este efecto. Demostraron además que el producto del gen UL41 de HSV1 desestabiliza los ARNm, tanto celulares como virales. Esta proteína está asociada con una rápida inhibición de la síntesis de proteínas del hospedador, la desagregación de los polirribosomas y la reducción de los niveles de ARNm del hospedador (Karlen et al. 1993).

Por lo cual, si bien se observó un aumento de la expresión de los oncogenes en las líneas celulares infectadas por HPV16 y transfectadas, siendo menos evidente o nula la expresión en las infectadas por HPV18, consideramos que es necesario profundizar el estudio del posible efecto sinérgico de los tres agentes infecciosos y ampliar en las metodologías respecto a las diferentes inhibiciones que pueden estar ocurriendo en estos experimentos *in vitro*. Como ejemplo de esto último podemos describir a la cicloheximida, conocida por inhibir la síntesis macromolecular de células de mamíferos, pero no el de *Chlamydiae* (Sabet 1984). Las diferentes especies de *Chlamydiae* responden con un aumento de su crecimiento ante el bloqueo de la síntesis de proteínas eucariotas con agentes como la cicloheximida. Otras investigaciones respaldan un modelo en el que, en condiciones normales de crecimiento, las *Chlamydiae* compiten con la célula hospedadora por grupos de aminoácidos citosólicos libres, así como por los producidos a partir de la degradación proteolítica lisosómica. Los CE contienen transportadores de aminoácidos y oligopéptidos y poco después de la infección y la diferenciación, el CR adquiere aminoácidos probablemente utilizando estos transportadores; es decir, *C. trachomatis* compete con la célula hospedadora utilizando sus transportadores de aminoácidos. La cicloheximida bloquea el uso de aminoácidos en las células hospedadoras, lo que aumenta los grupos de aminoácidos libres e inhibe la degradación de proteínas mediada por lisosomas, favoreciendo el desarrollo de *C. trachomatis* (Ouellette et al. 2011).

De esta manera, la observación más evidente del aumento de la expresión de los oncogenes en todas las líneas celulares, particularmente a las 48 hpi, podría estar relacionado con el agregado de cicloheximida al medio de infección. La adición, por

---

protocolo, de este antibiótico al medio de cultivo se utiliza para evitar un sobrecrecimiento de las monocapas celulares, tras varias horas pos infección y con el fin de lograr un óptimo desarrollo del ciclo de vida de la *C. trachomatis*. En relación a esto, hipotetizamos que, durante las primeras horas de infección, tanto *C. trachomatis* como HSV1 utilizan al máximo la maquinaria celular para comenzar su desarrollo y replicación, razón por la cual el efecto sinérgico de las co- infecciones, son observadas principalmente luego de las 48 hpi en las líneas celulares estudiadas.

En líneas generales, estos resultados nos indican que, efectivamente *C. trachomatis* estaría ejerciendo un sinergismo en co- infección con HPV, al incrementar la expresión relativa de los oncogenes E6 y E7 de los HPV 16 y 18. Por su parte, HSV1 solo estaría produciendo un efecto sinérgico con HPV frente al genotipo 16, no así con el HPV18.

Si bien los datos no son concluyentes, ya que no se observó el mismo comportamiento de expresión en todas las líneas celulares estudiadas, es necesario ahondar en los mecanismos sinérgicos de estas infecciones a fin de dilucidar la participación de cada uno de los microorganismos estudiados, frente a las co- infecciones.

Se debe tener en cuenta también que todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo difieren en numerosas características, tanto a nivel genético como morfológico, razón por la cual tanto las infecciones realizadas como también el genoma del HPV integrado, no se debieran comportar de la misma manera en cada una de ellas. Datos de otros autores demostraron que, a pesar de las grandes diferencias genéticas entre las células HeLa y C33A, la expresión ectópica del oncogén E6 HPV16 es suficiente para conferir un fenotipo similar entre la línea celular HeLa y las células C33A durante la inanición por triptófano. La expresión de E6 del HPV16 en células C33A reduce el triptófano intracelular libre y simultáneamente impondría un bloqueo al desarrollo de *C. trachomatis* (Sherchand et al. 2016), efecto inverso al que genera la adición de cicloheximida utilizada en medio de cultivo. Por estas razones es que sostenemos la necesidad de profundizar estos estudios en relación a las co- infecciones y sus efectos sinérgicos.

Otra respuesta al estrés asociado a la transformación, incluido el daño irreparable del ADN y la proliferación incontrolada, implica la muerte celular por apoptosis. En el cáncer, se altera el equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular que normalmente

---

mantiene la homeostasis del tejido sano (Lopez and Tait 2015). La apoptosis es un mecanismo importante mediante el cual el hospedador puede eliminar las células infectadas, y la capacidad de evitar la apoptosis puede aumentar la supervivencia del virus. Además, la apoptosis juega un papel importante durante la diferenciación de los queratinocitos (Yuan et al. 2012).

La vía extrínseca a la apoptosis implica la interacción de los receptores de la superficie celular con sus ligandos. La vía intrínseca más relevante implica la detección de niveles de estrés interno compatibles con la apoptosis, un cambio de equilibrio que favorece las proteínas proapoptóticas sobre las antiapoptóticas y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) con la liberación de la molécula activadora. Ambas vías convergen en la activación de caspasas, completando eficientemente la tarea de la muerte celular en minutos (Koff et al. 2015).

Las células cancerígenas pueden superar la respuesta apoptótica por diversos mecanismos. Las mutaciones inactivadoras que involucran a p53 hacen que la célula sea insensible a muchos estímulos apoptóticos. La regulación de las proteínas antiapoptóticas o la pérdida de proteínas proapoptóticas a través de medios genéticos o epigenéticos se producen en varios tumores. Es importante tener en cuenta que, aunque el resultado neto de esas alteraciones es una mayor supervivencia del tumor, esto no significa que todas las células dentro de un tumor sean insensibles a las señales apoptóticas. Si este fuera el caso, la mayoría de las terapias anticancerígenas actuales, efectivas al inducir el desprendimiento celular, serían inútiles y los tumores crecerían a tamaños absurdos (Labi and Erlacher 2015). Por el contrario, es probable que las células tumorales sean más sensibles a la estimulación apoptótica que las células normales y la apoptosis ocurre continuamente en tumores en crecimiento. De hecho, la apoptosis podría desempeñar un papel evolutivo en condiciones de presión selectiva al eliminar los linajes menos aptos, evacuar un nicho para el predominio de clones más adecuados y contribuir a la progresión del cáncer (Fouad and Aanei 2017). En relación a esto, se pudo observar que todas las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron susceptibles a doxorubicina, el estímulo apoptótico agregado.

La sobreexpresión de los principales oncogenes del HPV, E6 y E7, durante la transformación celular muy a menudo resulta en la resistencia de las células transformadas

---

a la apoptosis; esta capacidad para evitar la apoptosis es una de las principales características de la carcinogénesis de HPV (Yuan 2012). Además, otros estudios demuestran que la represión de E6 provoca que una fracción sustancial de células tumorales (por ejemplo, HeLa) sufran apoptosis después de varios días, remarcando así el rol de E6 de HPV en la inhibición de la apoptosis (DeFilippis et al. 2003).

Por otro lado, para completar su ciclo de desarrollo bifásico, *C. trachomatis* también ha desarrollado potentes estrategias para proteger las células infectadas contra los estímulos inductores de muerte. La carga metabólica colocada sobre la célula hospedadora durante la fase replicativa y las etapas posteriores de la infección por *C. trachomatis* inicia una serie de vías de señalización relacionadas con el estrés, que a su vez deben ser moduladas por el patógeno para mantener la viabilidad de la célula, asegurando así la supervivencia de *C. trachomatis* y permitiendo una infección productiva (Gonzalez et al. 2014, Siegl et al. 2014).

Además, se conoce que, dependiendo de la etapa de la infección, *C. trachomatis* puede inducir la muerte de la célula hospedadora o inhibir activamente la apoptosis. Las circunstancias que determinan si las *Chlamydias* inhiben o activan la muerte de las células hospedadoras reflejan varias consideraciones patógenas importantes, que incluyen si está en progreso una infección aguda o crónica y si el crecimiento de *Chlamydia* intracelular está programado para evolucionar a un ciclo infeccioso productivo o si bajo condiciones de crecimiento productivo inhibido evoluciona a una persistencia (Byrne and Ojcius 2004).

Para prevenir la señalización de apoptosis, *Chlamydia* administra las funciones celulares del hospedador. La replicación de *C. trachomatis* está restringida al entorno intracelular de las células epiteliales infectadas. La salida bacteriana de la célula se puede producir a través de la extrusión, que es un proceso no destructivo para la célula, o mediante la inducción de un modo de muerte de la célula hospedadora independiente de caspasas que puede ir acompañado de características morfológicas necróticas y/o apoptóticas (Sixt and Kroemer 2017).

En las etapas iniciales y medias de la infección, las células infectadas por *Chlamydia spp.* están protegidas contra la inducción de apoptosis tras la exposición a inductores potentes, incluidos, por ejemplo, la radiación UV, los productos químicos citotóxicos y los

---

mediadores inmunitarios. Específicamente, en las primeras etapas de la infección, *Chlamydia* degrada la proteína BH3, que es un iniciador de la activación de Bax, que regula al alza la proteína Mcl de la familia Bcl-2 del hospedador y facilita la inhibición de la apoptosis. En conjunto, se predice que estas actividades antiapoptóticas protegen el nicho replicativo del patógeno de los ataques citotóxicos, como el estrés inducido por infección y las señales de muerte que emanan de las células inmunitarias. En contraste, en las etapas finales de la infección, la *Chlamydia* promueve la apoptosis mediante la activación de Bax (Sixt and Kroemer 2017, Matsuo et al. 2019).

Las observaciones iniciales de otros autores demostraron una resistencia profunda a la apoptosis de las células HeLa infectadas por *C. trachomatis*. También se demostró que p53 se degrada proteolíticamente a partir de las 24 hpi con varias especies de *Chlamydia* en respuesta a la activación del eje de interacción clásico p53-MDM2. Además, se encontró que la inhibición farmacológica de esta interacción es suficiente para inhibir tanto el desarrollo intracelular del patógeno como para volver a sensibilizar a las células hospedadoras infectadas frente a los estímulos apoptóticos (Gonzalez et al. 2014). Desde entonces, se ha informado que las células HeLa son más resistentes a la apoptosis debido a la transformación con HPV (Vats et al. 2010).

Por otro lado, se ha informado que el HSV1 reduce la apoptosis celular en las células epiteliales, a pesar de los procesos de activación que involucran la desregulación de la proteína inhibidora de FLICE (c-FLIP), inhibidor de la caspasa-8 que generalmente resulta en la muerte celular (Kather et al. 2010, Tognarelli et al. 2019).

Es importante destacar también que, por su lado, la infección por HSV1 promueve el aumento de la expresión de p53 modulador de la apoptosis y produce permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) para liberar el citocromo c de la mitocondria y activa la caspasa-3, que finalmente culmina en la apoptosis. Sin embargo, esta inhibición de la apoptosis puede hacer que las células entren en necroptosis 12 h después de la infección, como un mecanismo de defensa alternativo para limitar la replicación y propagación del virus (Tognarelli et al. 2019).

Como bien se observaron en los resultados obtenidos en este trabajo, ocurrió una inhibición de apoptosis en todas las líneas celulares utilizadas, cuando fueron infectadas

---

tanto por *C. trachomatis* como por HSV1, sumado al aumento de la expresión del oncogén E6 en la mayoría de los modelos de infección; es decir, todos estos factores contribuyeron a la inhibición del proceso apoptótico, pese a que como se mencionó anteriormente, las células estaban susceptibles de sufrir apoptosis ante cualquier estímulo pro apoptótico.

A modo de conclusión, a través del estudio de todos estos procesos moleculares y celulares, podemos tener una aproximación acerca de lo que ocurre frente a infecciones de transmisión sexual como HPV, *C. trachomatis* y HSV, en referencia a su participación en lesiones oncogénicas, teniendo en cuenta que todos estos agentes patógenos fueron detectados en muestras de pacientes.

En líneas generales, frente a las co- infecciones de estos diferentes agentes, pudimos determinar que se produce un aumento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 y 18 en mayor o menor medida, e inhibición de apoptosis, lo cual genera un ambiente propicio para completar el ciclo de vida y la replicación de los agentes infecciosos. A su vez, se observó en aquellas líneas celulares infectadas persistentemente por HPV, la localización perinuclear de la proteína supresora de tumores p53, demostrando el efecto de E6 en la relocalización y degradación del mismo e impidiendo de esta manera que p53 ejerza su función supresora de tumores.

Las proteínas E6 y E7 juegan un papel importante en el mantenimiento de la proliferación y supervivencia de las células infectadas por HPV e implican que múltiples vías pueden imponer la senescencia de estas células. Debido a que las vías de senescencia endógena o apoptosis se activan si se reprime la expresión de los oncogenes, las terapias dirigidas contra cualquiera de las proteínas virales podrían ser beneficiosas; sin dejar de mencionar que previamente, ante co- infecciones por ejemplo por *C. trachomatis* o HSV, podemos acceder a tratamiento antimicrobiano y antiviral, respectivamente, disponibles en la actualidad. Se ha demostrado también que la co- infección de *C. trachomatis* con otros virus como HSV, induce la persistencia viral (Deka et al. 2007), por lo que, tratar las infecciones descritas anteriormente, nos ayudaría a reducir el riesgo de una lesión maligna, producto del sinergismo ejercido por los tres agentes.

---

En conclusión, es necesario profundizar aún más en los mecanismos involucrados en la carcinogénesis asociada a estas infecciones, ya que dilucidar las vías moleculares que llevan al desarrollo de lesiones cancerígenas en relación a la infección por diferentes patógenos de transmisión sexual redundará en terapias más efectivas, mejorando la calidad de vida de los pacientes y remarcando que la prevención y el control de las ITS tienen beneficios generalizados, particularmente en infecciones que se manifiestan de manera asintomática.

Sumado a esto, los tres agentes estudiados fueron detectados en todos los tipos de lesiones bucales e independientemente del sexo y la edad de los pacientes, y es importante remarcar que en los últimos años se ha identificado a la infección por *C. trachomatis* como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de lesiones malignas. Los datos recopilados hasta el momento apuntan a *C. trachomatis* como un co- factor candidato prometedor en la carcinogénesis, aunque, la pregunta de si la infección por *C. trachomatis* aumenta el riesgo de cáncer en los epitelios mucosos que infecta, no se ha respondido hasta el momento y aún es un tema de debate (Zhu et al. 2016). Las infecciones bacterianas detectadas a tiempo pueden ser tratadas con una dosis de antimicrobianos, lo que Podría reducir los riesgos del desarrollo de una lesión de mayor grado, particularmente frente a co- infecciones con otros agentes de transmisión sexual.

Estos primeros resultados nos abren las puertas para seguir investigando y estudiando acerca de dichos procesos relevantes, no solo para la salud de los pacientes, si no a un nivel de salud pública en la población general.

### 3. Conclusiones generales

- ✓ Los tres agentes estudiados fueron detectados en todos los tipos de lesiones bucales, ampliando el conocimiento de estos microorganismos infecciosos en un escenario poco estudiado en nuestra región y remarcando la importancia de su estudio con fines clínico- epidemiológicos.
- ✓ La prevalencia de HPV en muestras de lesiones bucales fue elevada con el 34,3%, hallándose 16,9% de prevalencia de *C. trachomatis* y 3% de HSV.
- ✓ Los genotipos de HPV más frecuentemente detectados fueron el 6 de bajo riesgo y el 16 de alto riesgo.
- ✓ No se encontró asociación entre los microorganismos detectados y el tipo de lesión bucal, sexo y edad de los pacientes.
- ✓ No se encontró relación entre la mayor carga viral de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 en las muestras de los pacientes, respecto al tipo de lesión, sexo, co- infección con *C. trachomatis* o factores de riesgo como tabaco y alcohol.
- ✓ Se hallaron las mutaciones puntuales más frecuentemente descriptas para la región E6 y LCR del HPV16 en todos los tipos de lesiones estudiadas, lo que resalta la importancia de estudiarlas, especialmente en las PMOD, las cuales tienen mayor predisposición a la malignización por sí solas y podría estar potenciada por la presencia de dichas mutaciones.
- ✓ Mostramos que las co- infecciones de los diferentes agentes estudiados (HPV, *C. trachomatis* y HSV) generan un sinergismo que produce un aumento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 y 18, inhibición de la apoptosis y de la función supresora de tumores de p53, lo cual genera un ambiente propicio para completar el ciclo de vida y la replicación de los agentes infecciosos, lo que podría promover o favorecer la transformación malignas.

# *Capítulo VI*

---

Bibliografía

---

## BIBLIOGRAFÍA

Aguas, S. and H. Lanfranchi (2004). Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. *Revista de la Facultad de Odontología (UBA)*. 2004;19: 21-30.

Ahmed, S. and N. A. Jafarey. Association of herpes simplex virus type-I and human papilloma virus with carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1995; 14(3-4): 193-196.

Aloni-Grinstein, R., M. Charni-Natan, H. Solomon and V. Rotter. p53 and the Viral Connection: Back into the Future. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(6): 178.

Andersson, S., M. Alemi, E. Rylander, A. Strand, B. Larsson, J. Sallstrom and E. Wilander. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*. 2000; 83(3): 307-310.

Andersson, S., H. Safari, M. Mints, I. Lewensohn-Fuchs, U. Gyllensten and B. Johansson. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*. 2005; 92(12): 2195-2200.

Angulo, M. and A. Carvajal-Rodriguez. Evidence of recombination within human alpha-papillomavirus. *Virol J*. 2007; 4: 33.

Badaracco, G., C. Rizzo, B. Mafera, B. Pichi, D. Giannarelli, S. S. Rahimi, M. G. Vigili and A. Venuti. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep*. 2007; 17(4): 931-939.

Baez, A., J. I. Almodovar, A. Cantor, F. Celestin, L. Cruz-Cruz, S. Fonseca, J. Trinidad-Pinedo and W. Vega. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck*. 2004; 26(9): 778-784.

Balint, E. E. and K. H. Vousden. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*. 2001; 85(12): 1813-1823.

Bates, S. and K. H. Vousden. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55(1): 28-37.

Bavin, P. J., J. A. Giles, A. Deery, J. Crow, P. D. Griffiths, V. C. Emery and P. G. Walker. Use of semi-quantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify women with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear report. *Br J Cancer*. 1993; 67(3): 602-605.

Beachler, D. C., E. A. Sugar, J. B. Margolick, K. M. Weber, H. D. Strickler, D. J. Wiley, R. D. Cranston, R. D. Burk, H. Minkoff, S. Reddy, W. Xiao, Y. Guo, M. L. Gillison and G. D'Souza. Risk factors for acquisition and clearance of oral human papillomavirus infection among HIV-infected and HIV-uninfected adults. *Am J Epidemiol*. 2015; 181(1): 40-53.

Benson, E., R. Li, D. Eisele and C. Fakhry. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2014; 50(6): 565-574.

Bernard, H. U. Regulatory elements in the viral genome. *Virology*. 2013; 445(1-2): 197-204.

Bernard, H. U., I. E. Calleja-Macias and S. T. Dunn. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006; 118(5): 1071-1076.

Bernard, H. U., S. Y. Chan, M. M. Manos, C. K. Ong, L. L. Villa, H. Delius, C. L. Peyton, H. M. Bauer and C. M. Wheeler. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*. 1994; 170(5): 1077-1085.

Bhatla, N., K. Puri, E. Joseph, A. Kriplani, V. K. Iyer and V. Sreenivas. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. *Indian J Med Res*. 2013; 137(3): 533-539.

Biondi, K., S. Belloni, M. Velasco, G. Robledo, F. Gallardo Femopase and H. Lanfranchi. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *J Dental Res*. 1998; 77(5): 1118- 1118.

Black, D. H. and R. Eberle. Detection and differentiation of primate alpha-herpesviruses by PCR. *J Vet Diagn Invest*. 1997; 9(3): 225-231.

Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(16): 7297-7301.

Brady, C. S., M. F. Duggan-Keen, J. A. Davidson, J. M. Varley and P. L. Stern. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol*. 1999; 80(12): 3233-3240.

Brosh, R. and V. Rotter. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(10): 701-713.

Brunham, R. C. and J. Rey-Ladino. Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(2): 149-161.

Burd, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(1): 1-17.

Burd, E. M. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29(2): 291-319.

Byrne, G. I. and D. M. Ojcius. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(10): 802-808.

Candotto, V., D. Lauritano, M. Nardone, L. Baggi, C. Arcuri, R. Gatto, R. M. Gaudio, F. Spadari and F. Carinci. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol (Rome)*. 2017; 10(3): 209-220.

Cento, V., M. Ciccozzi, L. Ronga, C. F. Perno and M. Ciotti. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J Med Virol*. 2009; 81(9): 1627-1634.

Cerasuolo, A., C. Annunziata, M. Tortora, N. Starita, G. Stellato, S. Greggi, M. G. Maglione, F. Ionna, S. Losito, G. Botti, L. Buonaguro, F. M. Buonaguro and M. L. Tornesello. Comparative analysis of HPV16 gene expression profiles in cervical and in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8(21): 34070-34081.

Ciapponi, A., A. Bardach, D. Glujovsky, L. Gibbons and M. A. Picconi. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25493.

Collins, S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, pharyngeal wall and nasopharynx. *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. J. Ballenger and J. Snow. Philadelphia, Williams & Wilkins: 1996; 249- 368.

Cornet, I., T. Gheit, S. Franceschi, J. Vignat, R. D. Burk, B. S. Sylla, M. Tommasino, G. M. Clifford and I. H. V. S. Group. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012; 86(12): 6855-6861.

Cornet, I., T. Gheit, M. R. Iannacone, J. Vignat, B. S. Sylla, A. Del Mistro, S. Franceschi, M. Tommasino and G. M. Clifford. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*. 2013; 108(1): 240-244.

Cox, M., N. Maitland and C. Scully. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1993; 29B(3): 215-219.

Criscuolo, M. I., P. Belardinelli, R. Morelato, J. P. Mosmann, R. F. Venezuela, A. X. Kiguen, C. G. Cuffini and S. A. Lopez De Blanc. "Prevalence of oral human papillomavirus (HPV) in the adult population of Córdoba, Argentina." *Transl Res Oral Oncol*. 2018 (3): 1-8.

Cuzick, J., G. Terry, L. Ho, T. Hollingworth and M. Anderson. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 1994; 69(1): 167-171.

Chaiwongkot, A., S. Vinokurova, C. Pientong, T. Ekalaksananan, B. Kongyingyoes, P. Kleebkaow, B. Chumworathayi, N. Patarapadungkit, M. Reuschenbach and M. von Knebel Doeberitz. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer*. 2013; 132(9): 2087-2094.

Chan, P. A., A. Robinette, M. Montgomery, A. Almonte, S. Cu-Uvin, J. R. Lonks, K. C. Chapin, E. M. Kojic and E. J. Hardy. Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2016: 5758387.

Chan, S. Y., H. Delius, A. L. Halpern and H. U. Bernard. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 1995; 69(5): 3074-3083.

Chaturvedi, A. K., E. A. Engels, R. M. Pfeiffer, B. Y. Hernandez, W. Xiao, E. Kim, B. Jiang, M. T. Goodman, M. Sibug-Saber, W. Cozen, L. Liu, C. F. Lynch, N. Wentzensen, R. C. Jordan, S. Altekruse, W. F. Anderson, P. S. Rosenberg and M. L. Gillison. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011; 29(32): 4294-4301.

Christensen, N. D. HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell* 2016; 3(9): 476-490.

Chumduri, C., R. K. Gurumurthy, P. K. Zadora, Y. Mi and T. F. Meyer. Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. *Cell Host Microbe.* 2013; 13(6): 746-758.

D'Souza, G., N. D. Gross, S. I. Pai, R. Haddad, K. S. Anderson, S. Rajan, J. Gerber, M. L. Gillison and M. R. Posner. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *J Clin Oncol.* 2014; 32(23): 2408-2415.

Dang, J. and Q. Feng. HPV16 infection in oral cavity and oropharyngeal cancer patients. *J Oral Sci.* 2016; 58(2): 265-269.

Dautry-Varsat, A., A. Subtil and T. Hackstadt. Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol.* 2005; 7(12): 1714-1722.

de Abreu, A. L., N. Malaguti, R. P. Souza, N. S. Uchimura, E. C. Ferreira, M. W. Pereira, M. D. Carvalho, S. M. Pelloso, M. G. Bonini, F. Gimenes and M. E. Consolar. Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am J Cancer Res.* 2016; 6(6): 1371-1383.

de la Fuente Hernández, J., P. Muñoz Mujica, C. E. Patron Bolaños, M. A. Ramirez Trujillo, H. J. Rojas Mercado and L. S. Acosta Torres. Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas." *Salud(i)Ciencia.* 2014; (20): 636-642.

de Sanjose, S., W. G. Quint, L. Alemany, D. T. Geraets, J. E. Klaustermeier, B. Lloveras, S. Tous, A. Felix, L. E. Bravo, H. R. Shin, C. S. Vallejos, P. A. de Ruiz, M. A. Lima, N. Guimera, O. Clavero, M. Alejo, A. Llombart-Bosch, C. Cheng-Yang, S. A. Tatti, E. Kasamatsu, E. Iljazovic, M. Odida, R. Prado, M. Seoud, M. Grce, A. Usubutun, A. Jain, G. A. Suarez, L. E. Lombardi, A. Banjo, C. Menendez, E. J. Domingo, J. Velasco, A. Nessa, S. C. Chichareon, Y. L. Qiao, E. Lerma, S. M. Garland, T. Sasagawa, A. Ferrera, D. Hammouda, L. Mariani, A. Pelayo, I. Steiner, E. Oliva, C. J. Meijer, W. F. Al-Jassar, E. Cruz, T. C. Wright, A. Puras, C. L. Llave, M. Tzardi, T. Agorastos, V. Garcia-Barriola, C. Clavel, J. Ordi, M. Andujar, X. Castellsague, G. I. Sanchez, A. M. Nowakowski, J. Bornstein, N. Munoz, F. X. Bosch, S. Retrospective International and H. P. V. T. T. S. Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010; 11(11): 1048-1056.

de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard and H. zur Hausen. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1): 17-27.

De Vuyst, H., G. Clifford, N. Li and S. Franceschi. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer.* 2009; 45(15): 2632-2639.

DeFilippis, R. A., E. C. Goodwin, L. Wu and D. DiMaio. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol.* 2003; 77(2): 1551-1563.

Deka, S., J. Vanover, J. Sun, J. Kintner, J. Whittimore and R. V. Schoborg. An early event in the herpes simplex virus type-2 replication cycle is sufficient to induce *Chlamydia trachomatis* persistence. *Cell Microbiol.* 2007; 9(3): 725-737.

Del Rio-Ospina, L., S. C. Soto-De Leon, M. Camargo, D. A. Moreno-Perez, R. Sanchez, A. Perez-Prados, M. E. Patarroyo and M. A. Patarroyo. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer.* 2015; 15: 100.

Deng, Z., M. Hasegawa, A. Kiyuna, S. Matayoshi, T. Uehara, S. Agena, Y. Yamashita, K. Ogawa, H. Maeda and M. Suzuki. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2013; 35(6): 800-808.

do Horto dos Santos Oliveira, L., V. Rodrigues Ede, A. P. de Salles Lopes, P. Fernandez Ade and S. M. Cavalcanti. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *Sao Paulo Med J.* 2003; 121(2): 67-71.

Doorbar, J., W. Quint, L. Banks, I. G. Bravo, M. Stoler, T. R. Broker and M. A. Stanley. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30: 55-70.

Drop, B., M. Strycharz-Dudziak, E. Kliszczewska and M. Polz-Dacewicz. Coinfection with Epstein-Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in Laryngeal, Oropharyngeal and Oral Cavity Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(12): e2752.

Faust, H., E. Eldenhed Alwan, A. Roslin, J. Wennerberg and O. Forslund. Prevalence of human papillomavirus types, viral load and physical status of HPV16 in head and neck squamous cell carcinoma from the South Swedish Health Care Region. *J Gen Virol.* 2016; 97(11): 2949-2956.

Flaitz, C. M. and M. J. Hicks. Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol.* 1998; 34(6): 448-453.

Fontecha, N., M. Basaras, S. Hernaez, D. Andia and R. Cisterna. Assessment of human papillomavirus E6/E7 oncogene expression as cervical disease biomarker. *BMC Cancer.* 2016; 16(1): 852.

Forman, D., C. de Martel, C. J. Lacey, I. Soerjomataram, J. Lortet-Tieulent, L. Bruni, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, M. Plummer and S. Franceschi. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 2012; 30: 12-23.

Fouad, Y. A. and C. Aanei. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017; 7(5): 1016-1036.

Freedman, D. A. and A. J. Levine. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(12): 7288-7293.

Gallo, G., M. Bibbo, L. Bagella, A. Zamparelli, F. Sanseverino, M. R. Giovagnoli, A. Vecchione and A. Giordano. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol.* 2003; 56(7): 532-536.

Ghittoni, R., R. Accardi, U. Hasan, T. Gheit, B. Sylla and M. Tommasino. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010; 40(1): 1-13.

Gillison, M. L., W. M. Koch, R. B. Capone, M. Spafford, W. H. Westra, L. Wu, M. L. Zahurak, R. W. Daniel, M. Viglione, D. E. Symer, K. V. Shah and D. Sidransky. "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9): 709-720.

Gonzalez, E., M. Rother, M. C. Kerr, M. A. Al-Zeer, M. Abu-Lubad, M. Kessler, V. Brinkmann, A. Loewer and T. F. Meyer. Chlamydia infection depends on a functional MDM2-p53 axis. *Nat Commun*. 2014; 5: 5201.

Gonzalez, J. V., R. A. Gutierrez, A. Keszler, C. Colacino Mdel, L. V. Alonio, A. R. Teyssie and M. A. Picconi. Human papillomavirus in oral lesions. *Medicina (B Aires)*. 2007; 67(4): 363-368.

Guidry, J. T. and R. S. Scott. The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Res*. 2017; 231: 139-147.

Guo, H., W. J. Kaiser and E. S. Mocarski. Manipulation of apoptosis and necroptosis signaling by herpesviruses. *Med Microbiol Immunol*. 2015; 204(3): 439-448.

Gupta, S. and S. Gupta. Role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A review of the literature. *Indian J Dent*. 2015; 6(2): 91-98.

Gutierrez, R. A., C. Colacino Mdel, M. A. Picconi, L. V. Alonio, A. R. Teyssie and M. Kessler. Detection and typing of HPV in oral lesions. *Dermatol Arg*. 2006; 2: 114-119.

Hacker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000; 301(1): 5-17.

Hamasuna, R., S. Hoshina, H. Imai, J. S. Jensen and Y. Osada. Usefulness of oral wash specimens for detecting *Chlamydia trachomatis* from high-risk groups in Japan. *Int J Urol*. 2007; 14(5): 473-475.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.

Hara, Y., T. Kimoto, Y. Okuno and Y. Minekawa. Effect of herpes simplex virus on the DNA of human papillomavirus 18. *J Med Virol*. 1997; 53(1): 4-12.

---

Harden, M. E. and K. Munger. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017; 772: 3-12.

Hayon, I. L. and Y. Haupt p53: an internal investigation. *Cell Cycle.* 2002; 1(2): 111-116.

Henderson, G., W. Peng, L. Jin, G. C. Perng, A. B. Nesburn, S. L. Wechsler and C. Jones. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J Neurovirol.* 2002; 8: 103-111.

Hietanen, S., S. Lain, E. Krausz, C. Blattner and D. P. Lane. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(15): 8501-8506.

Hillbertz, N. S., J. M. Hirsch, J. Jalouli, M. M. Jalouli and L. Sand. Viral and molecular aspects of oral cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32(10): 4201-4212.

Ho, L., S. Y. Chan, R. D. Burk, B. C. Das, K. Fujinaga, J. P. Icenogle, T. Kahn, N. Kiviat, W. Lancaster, P. Mavromara-Nazos and et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993; 67(11): 6413-6423.

Hofler, D., G. Bohmer, R. von Wasielewski, H. Neumann, G. Halec, D. Holzinger, B. Dondog, L. Gissmann, M. Pawlita and M. Schmitt. HPV16 RNA patterns defined by novel high-throughput RT-qPCR as triage marker in HPV-based cervical cancer precursor screening. *Gynecol Oncol.* 2015; 138(3): 676-682.

Holzinger, D., M. Schmitt, G. Dyckhoff, A. Benner, M. Pawlita and F. X. Bosch. Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res.* 2012; 72(19): 4993-5003.

Hoppe-Seyler, K., F. Bossler, J. A. Braun, A. L. Herrmann and F. Hoppe-Seyler. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol.* 2018; 26(2): 158-168.

Howie, H. L., R. A. Katzenellenbogen and D. A. Galloway. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009; 384(2): 324-334.

Howley PM and L. DR. Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology.* Fields BN, Knipe DM and Howley PM. Philadelphia, Lippincott-Raven: 2001; 2197- 2229p.

Hsieh, J. C., R. Kuta, C. R. Armour and P. E. Boehmer. Identification of two novel functional p53 responsive elements in the herpes simplex virus-1 genome. *Virology*. 2014; 460-461: 45-54.

Huang, C. G., L. A. Lee, K. C. Tsao, C. T. Liao, L. Y. Yang, C. J. Kang, K. P. Chang, S. F. Huang, I. H. Chen, S. L. Yang, L. Y. Lee, C. Hsueh, T. C. Chen, C. Y. Lin, K. H. Fan, T. C. Chang, H. M. Wang, S. H. Ng and T. C. Yen. Human papillomavirus 16/18 E7 viral loads predict distant metastasis in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2014; 61(2): 230-236.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Monograph. 2007; (89): 223- 273.

Ide, R., T. Mizoue, Y. Fujino, Y. Hoshiyama, K. Sakata, A. Tamakoshi, T. Yoshimura and J. S. Group. Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. *Oral Dis*. 2008; 14(4): 314-319.

Issaeva, N. p53 Signaling in Cancers. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(3): e332.

Jain, M. Assesment of Correlation of Herpes Simplex Virus-1 with Oral Cancer and Precancer- A Comparative Study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(8): 14-17.

Jalouli, M. M., J. Jalouli, B. Haseus, J. Ohman, J. M. Hirsch and L. Sand. Nested PCR for detection of HSV-1 in oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015; 20(6): e664-669.

Jenkins, W. D., K. LeVault and S. Sutcliffe. Chlamydia trachomatis infection: possible cofactor for oropharyngeal cancer development? *Oral Oncol*. 2015; 51(2): e8-9.

Jerome, K. R., Z. Chen, R. Lang, M. R. Torres, J. Hofmeister, S. Smith, R. Fox, C. J. Froelich and L. Corey. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol*. 2001; 167(7): 3928-3935.

Josefsson, A. M., P. K. Magnusson, N. Ylitalo, P. Sorensen, P. Qwarforth-Tubbin, P. K. Andersen, M. Melbye, H. O. Adami and U. B. Gyllensten. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000; 355(9222): 2189-2193.

Kalantari, M. and H. U. Bernard. Gene Expression of Papillomaviruses. Papillomavirus Research: natural history to vaccines and beyond. M. Saveria Campo. UK: 2006; 41- 52p.

Kalantari, M., E. Blennow, B. Hagmar and B. Johansson. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2001; 10(1): 46-54.

Kammer, C., M. Tommasino, S. Syrjanen, H. Delius, U. Hebling, U. Warthorst, H. Pfister and I. Zehbe. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer.* 2002; 86(2): 269-273.

Karim, S., T. Souho, M. Benlemlih and B. Bennani. Cervical Cancer Induction Enhancement Potential of Chlamydia Trachomatis: A Systematic Review. *Curr Microbiol.* 2018; 75(12): 1667-1674.

Karlen, S., E. A. Offord and P. Beard. Herpes simplex virions interfere with the expression of human papillomavirus type 18 genes. *J Gen Virol.* 1993; 74 (6): 965-973.

Kather, A., M. J. Raftery, G. Devi-Rao, J. Lippmann, T. Giese, R. M. Sandri-Goldin and G. Schonrich. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol.* 2010; 84(2): 1034-1046.

Kiguen, A. X., M. Marrama, S. Ruiz, P. Estofan, R. F. Venezuela, J. P. Mosmann, M. S. Monetti, V. Rivero and C. G. Cuffini. Prevalence, risk factors and molecular characterization of Chlamydia trachomatis in pregnant women from Cordoba, Argentina: A prospective study. *PLoS One.* 2019; 14(5): e0217245.

Kiguen, A. X., G. Ochonga, R. F. Venezuela, M. S. Monetti, M. C. Frutos, J. P. Mosmann and C. Cuffini. Chlamydia trachomatis in a girl suspected of sexual abuse in the city of Córdoba, Argentina. *Case Reports Clin Med.* 2014; 3(2): 97- 100.

Koff, J. L., S. Ramachandiran and L. Bernal-Mizrachi. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(2): 2942-2955.

Komarova, E. A., V. Krivokrysenko, K. Wang, N. Neznanov, M. V. Chernov, P. G. Komarov, M. L. Brennan, T. V. Golovkina, O. W. Rokhlin, D. V. Kuprash, S. A. Nedospasov, S. L. Hazen, E. Feinstein and A. V. Gudkov. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB J.* 2005; 19(8): 1030-1032.

Koromilas, A. E., S. Li and G. Matlashewski. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12(2-3): 157-170.

Koskinen, W. J., R. W. Chen, I. Leivo, A. Makitie, L. Back, R. Kontio, R. Suuronen, C. Lindqvist, E. Auvinen, A. Molijn, W. G. Quint, A. Vaheri and L. M. Aaltonen. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 2003; 107(3): 401-406.

Kreimer, A. R., R. K. Bhatia, A. L. Messegue, P. Gonzalez, R. Herrero and A. R. Giuliano. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2010; 37(6): 386-391.

Kristiansen, E., A. Jenkins and R. Holm. Coexistence of episomal and integrated HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol.* 1994; 47(3): 253-256.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3-11.

Kubbutat, M. H., S. N. Jones and K. H. Vousden. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997; 387(6630): 299-303.

Kun, D., C. Xiang-Lin, Z. Ming and L. Qi. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by inducing Bag-1 via the MAPK/ERK survival pathway. *Apoptosis.* 2013; 18(9): 1083-1092.

Labi, V. and M. Erlacher. How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1675.

Lan, J., J. M. Walboomers, R. Roosendaal, G. J. van Doornum, D. M. MacLaren, C. J. Meijer and A. J. van den Brule. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis*

in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(5): 1060-1065.

Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358(6381): 15-16.

Lazo, P. A. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 80(12): 2008-2018.

Lechner, M. S. and L. A. Laimins. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* 1994; 68(7): 4262-4273.

Lee, C., T. R. Wooldridge and L. A. Laimins. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology.* 2007; 358(1): 201-210.

Li, J. and J. Yuan. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 27(48): 6194-6206.

Liang, X. H., M. Volkmann, R. Klein, B. Herman and S. J. Lockett. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene.* 1993; 8(10): 2645-2652.

Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C. P. Mansur, V. Band and E. J. Androphy. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol.* 1999; 73(9): 7297-7307.

Lopez, J. and S. W. Tait. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer.* 2015; 112(6): 957-962.

Maki, J., H. Paavilainen, K. Kero, V. Hukkanen and S. Syrjanen. Herpes simplex and human papilloma virus coinfections in oral mucosa of men-A 6-year follow-up study. *J Med Virol.* 2018; 90(3): 564-570.

Manos, M. M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cell.* 1989; 7: 209-214.

Mantovani, F. and L. Banks. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 1999; 18(22): 3309-3315.

Maruzuru, Y., H. Fujii, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, A. Kato and Y. Kawaguchi. Roles of p53 in herpes simplex virus 1 replication. *J Virol.* 2013; 87(16): 9323-9332.

Maruzuru, Y., N. Koyanagi, N. Takemura, S. Uematsu, D. Matsubara, Y. Suzuki, J. Arii, A. Kato and Y. Kawaguchi. p53 Is a Host Cell Regulator during Herpes Simplex Encephalitis. *J Virol.* 2016; 90(15): 6738-6745.

Matsuo, J., S. Haga, K. Hashimoto, T. Okubo, T. Ozawa, M. Ozaki and H. Yamaguchi. Activation of caspase-3 during *Chlamydia trachomatis*-induced apoptosis at a late stage. *Can J Microbiol.* 2019; 65(2): 135-143.

McBride, A. A. and A. Warburton. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017; 13(4): e1006211.

Merrit, J., D. Kadouri and G. O'Toole. Current protocols in microbiology. Growing and Analyzing Static Biofilms. J. W. a. Sons. 2005.

Metgud, R., M. Astekar, M. Verma and A. Sharma. Role of viruses in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rev.* 2012; 6(2): e21.

Millar, E. P. and M. J. Troulis. Herpes zoster of the trigeminal nerve: the dentist's role in diagnosis and management. *J Can Dent Assoc.* 1994; 60(5): 450-453.

Mizutani, H., S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima and S. Kawanishi. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 2005; 76(13): 1439-1453.

Monetti, M. S., R. Molina, P. Estofan, M. C. Frutos, A. X. Kiguen, R. F. Venezuela, M. A. Paglini and C. G. Cuffini. Distribution of *Chlamydia trachomatis* genotypes in infertile patients of Cordoba, Argentina. *Int J Virol Mol Biol.* 2013; 1(2): 1- 6.

Moody, C. A. and L. A. Laimins. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(8): 550-560.

Mosmann, J. P., M. S. Monetti, M. C. Frutos, A. X. Kiguen, R. F. Venezuela and C. G. Cuffini. Mutation detection of E6 and LCR genes from HPV 16 associated with carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(3): 1151-1157.

Mosmann, J. P., A. D. Talavera, M. I. Criscuolo, R. F. Venezuela, A. X. Kiguen, R. Panico, R. Ferreyra De Prato, S. A. Lopez De Blanc, V. Re and C. G. Cuffini. Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: Human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and Herpes simplex virus. *J Oral Microbiol.* 2019; 11(1): e1632129.

Motrich, R. D., C. Cuffini, J. P. Oberti, M. Maccioni and V. E. Rivero. Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. *J Infect.* 2006; 53(3): 175-183.

Mravak-Stipetic, M., I. Sabol, J. Kranjcic, M. Knezevic and M. Grce. Human papillomavirus in the lesions of the oral mucosa according to topography. *PLoS One.* 2013; 8(7): e69736.

Nair, S. and M. R. Pillai. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.* 2005; 11(6): 350-359.

Nakashima, K., K. Shigehara, S. Kawaguchi, A. Wakatsuki, Y. Kobori, K. Nakashima, Y. Ishii, M. Shimamura, T. Sasagawa, Y. Kitagawa, A. Mizokami and M. Namiki. Prevalence of human papillomavirus infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., and *Ureaplasma* spp. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 43.

Naldini, G., C. Grisci, M. Chiavarini and R. Fabiani. Association between human papillomavirus and chlamydia trachomatis infection risk in women: a systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health.* 2019; 64(6): 943-955.

Ndiaye, C., M. Mena, L. Alemany, M. Arbyn, X. Castellsague, L. Laporte, F. X. Bosch, S. de Sanjose and H. Trottier. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014; 15(12): 1319-1331.

Ng, M., M. K. Freeman, T. D. Fleming, M. Robinson, L. Dwyer-Lindgren, B. Thomson, A. Wollum, E. Sanman, S. Wulf, A. D. Lopez, C. J. Murray and E. Gakidou. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA.* 2014; 311(2): 183-192.

Nguyen, B. D., D. Cunningham, X. Liang, X. Chen, E. J. Toone, C. R. Raetz, P. Zhou and R. H. Valdivia. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(25): 10284-10289.

Nolan, T., R. E. Hands and S. A. Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1(3): 1559-1582.

Noonan, V. L. and S. Kabani. Diagnosis and management of suspicious lesions of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am.* 2005; 38(1): 21-35.

O'Brate, A. and P. Giannakakou. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat.* 2003; 6(6): 313-322.

O'Connor, M. J., S. H. Tan, C. H. Tan and H. U. Bernard. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* 1996; 70(10): 6529-6539.

O'Connor, M., S. Y. Chan and H. U. Bernard. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Human papillomaviruses.* 1995; 21-40.

Ojcius, D. M., H. Degani, J. Mispelter and A. Dautry-Varsat. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia. NMR studies of living cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(12): 7052-7058.

Ouellette, S. P., F. C. Dorsey, S. Moshich, J. L. Cleveland and R. A. Carabeo. Chlamydia species-dependent differences in the growth requirement for lysosomes. *PLoS One.* 2011; 6(3): e16783.

Paba, P., D. Bonifacio, L. Di Bonito, D. Ombres, C. Favalli, K. Syrjanen and M. Ciotti. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology.* 2008; 51(4): 230-234.

Pai, S. I. and W. H. Westra. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 49-70.

Pande, S., N. Jain, B. K. Prusty, S. Bhambhani, S. Gupta, R. Sharma, S. Batra and B. C. Das. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(3): 1060-1066.

Park, D. J., S. P. Wilczynski, R. L. Paquette, C. W. Miller and H. P. Koeffler. p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. *Oncogene.* 1994; 9(1): 205-210.

Park, J. S., E. S. Hwang, S. N. Park, H. K. Ahn, S. J. Um, C. J. Kim, S. J. Kim and S. E. Namkoong. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 1997; 65(1): 121-129.

Parker, T. M., E. M. Smith, J. M. Ritchie, T. H. Haugen, V. Vonka, L. P. Turek and E. Hamsikova. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncol.* 2006; 42(3): 288-296.

Patel, D., S. M. Huang, L. A. Baglia and D. J. McCance. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* 1999; 18(18): 5061-5072.

Peitsaro, P., B. Johansson and S. Syrjanen. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 886-891.

Pentenero, M., R. Broccoletti, M. Carbone, D. Conrotto and S. Gandolfo. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. *Oral Dis.* 2008; 14: 356-366.

Petito, G., M. A. Carneiro, S. H. Santos, A. M. Silva, R. C. Alencar, A. P. Gontijo and V. A. Saddi. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017; 83(1): 38-44.

Picconi, M. A., L. V. Alonio, A. Garcia Carranca, M. Lizano, G. Cervantes Vazquez, A. L. Distefano, J. Mural, G. Bazan and A. R. Teysie. Molecular variants of human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix. *Medicina (B Aires).* 2000; 60(6): 889-894.

Pilco-Ferreto, N. and G. M. Calaf. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2016; 49(2): 753-762.

Pistritto, G., D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi and G. D'Orazi. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016; 8(4): 603-619.

Plummer, M., M. Schiffman, P. E. Castle, D. Maucort-Boulch, C. M. Wheeler and A. Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women

with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007; 195(11): 1582-1589.

Pousa Castro, X. and A. Bascones Martínez. Herpesvirus. *Av Odontoestomatol.* 2011; 1(27): 11- 22.

Proia, N. K., G. M. Paszkiewicz, M. A. Nasca, G. E. Franke and J. L. Pauly. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(6): 1061-1077.

Prusty, B. K., G. Krohne and T. Rudel. Reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus-6 by telomeric circle formation. *PLoS Genet.* 2013; 9(12): e1004033.

Ramanakumar, A. V., O. Goncalves, H. Richardson, P. Tellier, A. Ferenczy, F. Coutlee and E. L. Franco. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 326.

Ramchandani, M., M. Kong, E. Tronstein, S. Selke, A. Mikhaylova, A. Magaret, M. L. Huang, C. Johnston, L. Corey and A. Wald. Herpes Simplex Virus Type 1 Shedding in Tears and Nasal and Oral Mucosa of Healthy Adults. *Sex Transm Dis.* 2016; 43(12): 756-760.

Rautava, J., J. Willberg, K. Louvanto, L. Wideman, K. Syrjanen, S. Grenman and S. Syrjanen. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS One.* 2012; 7(8): e42171.

Reyes, M., G. Rojas-Alcayaga, G. Pennacchiotti, D. Carrillo, J. P. Munoz, N. Pena, R. Montes, N. Lobos and F. Aguayo. Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients. *Exp Mol Pathol.* 2015; 99(1): 95-99.

Ribeiro, M. G., L. D. Marcolino, B. R. Ramos, E. A. Miranda, C. L. Trento, S. Jain, R. Q. Gurgel, M. G. Silva and S. S. Dolabella. High prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral mucosal lesions of patients at the Ambulatory of Oral Diagnosis of the Federal University of Sergipe, Northeastern Brazil. *J Appl Oral Sci;* 2017; 25(1): 69-74.

Roberts, C. C., R. Swoyer, J. T. Bryan and F. J. Taddeo. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping

PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(5): 1899-1906.

Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane and R. T. Hay. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.* 1991; 18(22): 6455-6461.

Roth, J. and M. Dobbstein. Failure of viral oncoproteins to target the p53-homologue p51A. *J Gen Virol.* 1999; 80: 3251-3255.

Ryan, K. M., A. C. Phillips and K. H. Vousden. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(3): 332-337.

Saraste, A. and K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(3): 528-537.

Sarkar, A. K., G. Tortolero-Luna, M. Follen and K. J. Sastry. Inverse correlation of cellular immune responses specific to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in a cross-sectional study. *Gynecol Oncol.* 2005; 99: 251-261.

Sato, Y. and T. Tsurumi. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev Med Virol.* 2013; 23(4): 213-220.

Saunier, M., S. Monnier-Benoit, F. Mauny, V. Dalstein, J. Briolat, D. Riethmuller, B. Kantelip, E. Schwarz, C. Mouglin and J. L. Pretet. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(11): 3678-3685.

Scott, D. A., W. A. Coulter and P. J. Lamey. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26(10): 441-447.

Scully, C., J. Epstein, S. Porter and M. Cox. Viruses and chronic disorders involving the human oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 72(5): 537-544.

Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine and P. M. Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990; 63(6): 1129-1136.

Schmauz, R., P. Okong, E. M. de Villiers, R. Dennin, L. Brade, S. K. Lwanga and R. Owor. Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. *Int J Cancer*. 1989; 43(5): 805-809.

Schmidt, M., W. Kedzia and A. Gozdzicka-Jozefiak. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol*. 2001; 23(1-2): 65-77.

Schmitt, M., V. Dalstein, T. Waterboer, C. Clavel, L. Gissmann and M. Pawlita. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer Res*. 2010; 70(1): 249-256.

Seedorf, K., G. Krammer, M. Durst, S. Suhai and W. G. Rowekamp. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985; 145(1): 181-185.

Sherchand, S. P., J. A. Ibana, A. H. Zea, A. J. Quayle and A. Aiyar. The High-Risk Human Papillomavirus E6 Oncogene Exacerbates the Negative Effect of Tryptophan Starvation on the Development of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0163174.

Sherman, M. E., M. Schiffman, J. T. Cox and G. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(2): 102-107.

Sichero, L., J. S. Sobrinho and L. L. Villa. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*. 2012; 432(1): 127-132.

Siegl, C., B. K. Prusty, K. Karunakaran, J. Wischhusen and T. Rudel. Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Rep*. 2014; 9(3): 918-929.

Siegl, C. and T. Rudel. Modulation of p53 during bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(12): 741-748.

Sixt, B. S. and G. Kroemer. *Chlamydia* Anti-apoptosis - A By-product of Metabolic Reprogramming? *EBioMedicine*. 2017; 23: 2-3.

Slade, J. A. and R. V. Schoborg. Human Papilloma Virus and Chlamydia trachomatis: Casual Acquaintances or Partners in Crime? *Curr Clin Micro Rpt.* 2019; 2(6): 76-87.

Smith, B., Z. Chen, L. Reimers, K. van Doorslaer, M. Schiffman, R. Desalle, R. Herrero, K. Yu, S. Wacholder, T. Wang and R. D. Burk. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS One.* 2011; 6(6): e21375.

Sotlar, K., A. Stubner, D. Diemer, S. Menton, M. Menton, K. Dietz, D. Wallwiener, R. Kandolf and B. Bultmann. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2004; 74(1): 107-116.

Stanley, M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer.* 2010; 5: 19.

Starr, J. R., J. R. Daling, E. D. Fitzgibbons, M. M. Madeleine, R. Ashley, D. A. Galloway and S. M. Schwartz. Serologic evidence of herpes simplex virus 1 infection and oropharyngeal cancer risk. *Cancer Res.* 2001; 61(23): 8459-8464.

Stephens, R. S., R. Sanchez-Pescador, E. A. Wagar, C. Inouye and M. S. Urdea. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *J Bacteriol.* 1987; 169(9): 3879-3885.

Sun, C. A., J. F. Liu, D. M. Wu, S. Nieh, C. P. Yu and T. Y. Chu. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002; 76(1): 41-47.

Sun, C. X., N. Bennett, P. Tran, K. D. Tang, Y. Lim, I. Frazer, L. Samaranayake and C. Punyadeera. A Pilot Study into the Association between Oral Health Status and Human Papillomavirus-16 Infection. *Diagnostics (Basel).* 2017; 7(1).

Swan, D. C., R. A. Tucker, G. Tortolero-Luna, M. F. Mitchell, L. Wideroff, E. R. Unger, R. A. Nisenbaum, W. C. Reeves and J. P. Icenogle. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4): 1030-1034.

Syrjanen, S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol.* 2003; 192(3): 123-128.

Syrjanen, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci.* 2018; 126: 49-66.

Szarka, K., I. Tar, E. Feher, T. Gall, A. Kis, E. D. Toth, R. Boda, I. Marton and L. Gergely. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(4): 314-318.

Taberna, M., M. Mena, M. A. Pavon, L. Alemany, M. L. Gillison and R. Mesia. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017; 28(10): 2386-2398.

Taghizadeh, E., S. Jahangiri, D. Rostami, F. Taheri, P. G. Renani, H. Taghizadeh and S. M. Gheibi Hayat. Role of E6 and E7 Human Papillomavirus Proteins in Molecular Pathogenesis of Cervical Cancer. *Curr Protein Pept Sci.* 2019; 20(9): 926-934.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725-2729.

Termine, N., L. Giovannelli, V. Rodolico, D. Matranga, G. Pannone and G. Campisi. Biopsy vs. brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2012; 48(9): 870-875.

Thomas, M., N. Narayan, D. Pim, V. Tomaic, P. Massimi, K. Nagasaka, C. Kranjec, N. Gammoh and L. Banks. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene.* 2008; 27(55): 7018-7030.

Thomas, M., D. Pim and L. Banks. The role of the HPV E6 oncoprotein in malignant progression. *Papillomavirus research: natural history to vaccines and beyond.* M. Saveria Campo. 2006; 115- 131.

Tognarelli, E. I., T. F. Palomino, N. Corrales, S. M. Bueno, A. M. Kalergis and P. A. Gonzalez. Herpes Simplex Virus Evasion of Early Host Antiviral Responses. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 127.

Tornesello, M. L., F. Perri, L. Buonaguro, F. Ionna, F. M. Buonaguro and F. Caponigro. HPV-related oropharyngeal cancers: from pathogenesis to new therapeutic approaches. *Cancer Lett.* 2014; 351(2): 198-205.

---

Tumban, E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*. 2019; 11(10): e922.

Underbrink, M. P., S. L. Hoskins, A. M. Pou and T. Albrecht. Viral interaction: a possible contributing factor in head and neck cancer progression. *Acta Otolaryngol*. 2008; 128(12): 1361-1369.

van Rooijen, M. S., M. F. van der Loeff, S. A. Morre, A. P. van Dam, A. G. Speksnijder and H. J. de Vries. Spontaneous pharyngeal Chlamydia trachomatis RNA clearance. A cross-sectional study followed by a cohort study of untreated STI clinic patients in Amsterdam, The Netherlands. *Sex Transm Infect*. 2015; 91(3): 157-164.

Vanover, J., J. Kintner, J. Whittimore and R. V. Schoborg. Interaction of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein D with the host cell surface is sufficient to induce Chlamydia trachomatis persistence. *Microbiology*. 2010; 156: 1294-1302.

Vats, V., T. Agrawal, S. Salhan and A. Mittal. Characterization of apoptotic activities during chlamydia trachomatis infection in primary cervical epithelial cells. *Immunol Invest*. 2010; 39(7): 674-687.

Venezuela, R. F., A. D. Talavera, M. C. Frutos, A. X. Kiguen, M. S. Monetti, M. Sollazo, R. Panico, R. Ferreyra De Prato and C. G. Cuffini. Human Papillomavirus (HPV) in oral cavity lesions: comparison with other oral cancer risk factors. *J Microbiol Res*. 2013; (3): 228-233.

Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levin. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408(6810): 307-310.

Vriend, H. J., J. A. Bogaards, J. E. van Bergen, A. A. Brink, I. V. van den Broek, C. J. Hoebe, A. J. King, M. A. van der Sande, P. F. Wolffs, H. E. de Melker, L. Medical Microbiological and C. S. I. g. the. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis co-infection. *Cancer Med*. 2015; 4(10): 1589-1598.

Wald, A., M. Ericsson, E. Krantz, S. Selke and L. Corey. Oral shedding of herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Infect*. 2004; 80(4): 272-276.

Whitman, W. Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2001

Woo, S. B. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head Neck Pathol.* 2019; 13(3): 423-439.

Wood, N. H., O. A. Ayo-Yusuf, T. S. Gugushe and J. P. Bogers. Tobacco use and oral sex practice among dental clinic attendees. *PLoS One.* 2019; 14(3): e0213729.

Woodman, C. B., S. I. Collins and L. S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* . 2007; 7(1): 11-22.

Xi, L. F., J. P. Hughes, P. E. Castle, Z. R. Edelstein, C. Wang, D. A. Galloway, L. A. Koutsky, N. B. Kiviat and M. Schiffman. Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study. *J Infect Dis.* 2011; 203(10): 1425-1433.

Xia, Y. and L. Xiong. Progress in genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *Chin Med J (Engl).* 2014; 127(22): 3980-3986.

Yaginuma, Y. and H. Westphal. Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1991; 51(24): 6506-6509.

Yamada, T., M. M. Manos, J. Peto, C. E. Greer, N. Munoz, F. X. Bosch and C. M. Wheeler. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997; 71(3): 2463-2472.

Yamada, T., C. M. Wheeler, A. L. Halpern, A. C. Stewart, A. Hildesheim and S. A. Jenison. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 1995; 69(12): 7743-7753.

Ylitalo, N., P. Sorensen, A. M. Josefsson, P. K. Magnusson, P. K. Andersen, J. Ponten, H. O. Adami, U. B. Gyllensten and M. Melbye. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet.* 2000; 355(9222): 2194-2198.

Yuan, C. H., M. Filippova and P. Duerksen-Hughes. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses.* 2012; 4(12): 3831-3850.

Zehbe, I., J. Mytilineos, I. Wikstrom, R. Henriksen, L. Edler and M. Tommasino. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen

class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol.* 2003; 64(5): 538-542.

Zehbe, I., C. Richard, C. A. DeCarlo, A. Shai, P. F. Lambert, H. Lichtig, M. Tommasino and L. Sherman. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology.* 2009; 383(1): 69-77.

Zehbe, I., R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander and M. Tommasino. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer.* 2001; 94(5): 711-716.

Zhang, Y. and Y. Xiong. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science.* 2001; 292(5523): 1910-1915.

Zhe, X., H. Xin, Z. Pan, F. Jin, W. Zheng, H. Li, D. Li, D. Cao, Y. Li, C. Zhang, S. Fu, R. Shao and Z. Pan. Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papillomavirus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China. *Cancer Cell Int.* 2019; 19: 65.

Zhou, G., V. Galvan, G. Campadelli-Fiume and B. Roizman. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol.* 2000; 74(24): 11782-11791.

Zhu, H., Z. Shen, H. Luo, W. Zhang and X. Zhu. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(13): e3077.

Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard and M. J. O'Connor. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* 1999; 73(8): 6209-6219.

Zuna, R. E., E. Tuller, N. Wentzensen, C. Mathews, R. A. Allen, R. Shanesmith, S. T. Dunn, M. A. Gold, S. S. Wang, J. Walker and M. Schiffman. HPV16 variant lineage,

clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 2011; 6: 19.

zur Hausen, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991; 184(1): 9-13.

zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1288(2): F55-78.

zur Hausen, H. Papillomavirus and p53. *Nature*. 1998; 393(6682): 217.

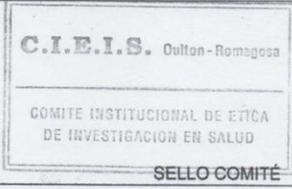
zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virol*. 2009; 384(2): 260-265.

# *Capítulo VII*

---

Anexos

## Anexo I: Aprobación del Comité de Ética

FORMULARIO DE RESOLUCIÓN	
	
<b>COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD OULTON ROMAGOSA</b>	
<b>INFORME DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN no sponsorados</b>	
Título del Protocolo:	<i>Detección del Papilomavirus Humano (VPH) en lesiones de la cavidad oral : comparación con otros factores de riesgo</i>
Investigador Principal	Raúl Fernando Venezuela
Lugar de realización	Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano del Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella
CRO/Patrocinante	Sin Sponsor
Los siguientes documentos fueron recibidos, revisados y evaluados:	Protocolo versión 1.0 de fecha 15.feb.2012 Formulario de Consentimiento Informado y Hoja de Información al paciente Versión 1.0 de fecha 15.feb.2012 Historia Clínica Versión 1.0 del 15.feb.2012
Fecha de recepción por el CIEIS	22 de febrero de 2012
Fecha de resolución por el CIEIS	21 MAR. 2012
<b>RESOLUCIÓN</b>	<b>APROBADO <del>CON</del> RECOMENDACIÓN</b>
Institución: Instituto Oulton- Clínica Privada Romagosa Firma en nombre del Comité:  Aclaración de firma y sello: <u>Dr. Sergio Vasto</u> Nombre del Comité: CIEIS Oulton -Romagosa Lugar y fecha: Córdoba, 21 MAR. 2012	
	
POE 01-GD-03.1 anexo CIEIS OULTON ROMAGOSA	
Pág. 1	

## **Anexo II:**

### **Consentimiento informado para el estudio de muestras de pacientes**

#### **FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

##### **- Detección de VPH en Lesiones de la Cavidad Oral.-**

Código de Identificación del voluntario: \_ \_ \_ \_ \_

**TÍTULO DEL ESTUDIO: “Detección del Papilomavirus Humano (VPH) en Lesiones de la Cavidad Oral: Comparación con otros Factores de Riesgo”**

#### **LUGAR DE DESARROLLO DEL ESTUDIO:**

Cátedra de Estomatología, Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba.

Laboratorio de Clamidas y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología “Dr.J.M.Vanella”

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

**Dirección:** Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria CP: 5016. Córdoba.

**Teléfono:** (0351) 4334022

**Teléfono de contacto durante las 24 hs:** (0351)153311267

**INVESTIGADORES PRINCIPALES:** Bioq. Esp. En Virol. Raúl F VENEZUELA. Od. Ángel TALAVERA. Dra. Cecilia CUFFINI. Dra. Ruth FERREYRA de PRATO. Dr. René PANICO

#### **Lea esta información cuidadosamente:**

Usted ha aceptado que parte de la muestra obtenida para el diagnóstico Histopatológico, sea utilizada para realizar la detección del Papilomavirus Humano (VPH). Con este formulario se le está solicitando que participe en un estudio que incluye la detección de VPH en muestras de la cavidad oral. Firmar el presente consentimiento, confirma que usted está de acuerdo en participar en este estudio e indica su deseo de participar en este momento. Su participación en la investigación es opcional. Antes de brindar su consentimiento, por favor lea este formulario. Formule tantas preguntas como necesite, para asegurarse que comprende que implicará participar en esta investigación.

Una vez que ha presentado su consentimiento, aún tiene derecho de retirarse del estudio sin poner en riesgo su seguimiento y/o tratamiento.

Recibirá una copia firmada de este formulario para que la conserve y a la que deberá remitirse si lo necesitara.

## ¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO?

El Papilomavirus Humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes. Varios genotipos de VPH pueden generar verrugas genitales, y otros están fuertemente asociados a displasia cervical, cáncer de cuello uterino, de vulva, ano, pene y de orofaringe.

La alta prevalencia de la infección por este virus en caso de lesiones orales premalignas indica que la infección podría ser un evento temprano en el proceso de transformación maligna de las células epiteliales de la cavidad oral. La asociación epidemiológica del VPH con Carcinoma de Células Escamosa, así como la evidencia biológica dado por la transformación de las células epiteliales por oncogenes del virus, sugiere que los VPH específicos son importantes para el proceso de malignización, sin que éste determine el tamaño ni el estado del tumor.

La asociación causal entre el consumo de tabaco y/o alcohol y el desarrollo de carcinoma oral de células escamosas ha sido establecida, sin embargo es significativo el porcentaje de estos cánceres que ocurren en pacientes que no consumen tabaco y/o alcohol, lo que implicaría la presencia de otros factores de riesgo.

Es importante destacar que las muestras serán obtenidas en la Cátedra de Estomatología de la Facultad de Odontología U.N.C o en la guardia de la misma facultad y posteriormente enviadas al Instituto de Virología para la detección de *VPH*, **si Ud como paciente está de acuerdo y ha firmado el consentimiento informado.**

## ¿QUÉ IMPLICA MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Mi participación en este estudio significa permitir:

1. Que una parte de la muestra obtenida para el diagnóstico histopatológico, sea utilizada para la detección del Papilomavirus Humano.
2. Completar una ficha (en Anexos) con:
  - a. características clínicas: motivo de la consulta.
  - b. características epidemiológicas: edad, sexo, tipo de actividad laboral y hábitos personales con respecto al tabaco, alcohol y sexo.

## ¿DE QUE MANERA MI IDENTIDAD Y RESULTADOS SE MANTENDRÁN CONFIDENCIALES?

Los investigadores principales de este estudio han tomado varias medidas para mantener la confidencialidad de los participantes. Estas se describen a continuación.

### I. Codificación de la Muestra de Cepillado de la Cavidad Oral.

Su muestra no tendrá su nombre ni su dirección en ella.

Su muestra estará codificada con un número de cuatro cifras que van desde el 0001 al 1000; este número vincula directamente su muestra y los resultados con su nombre. Los profesionales que realicen los análisis de laboratorio no conocerán su identidad a partir de este número de código. Las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) y los investigadores pueden acceder a la lista. Esto es para asegurar que el estudio esté realizado en forma

correcta. Al firmar el formulario de consentimiento informado, está autorizando esta revisión.

## **II. Acceso Restringido a su Muestra de Cepillado de la Cavidad Oral.**

El Instituto de Virología “Dr.J.M.Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba controlará y guardará su muestra en una habitación segura. Sólo se permitirá la entrada a personal autorizado. Sólo podrán tener acceso a la misma, el Bioq. Raul F Venezuela, el Od. Ángel Talavera y la Dra. Cecilia Cuffini.

## **III. Acceso Restringido a los Resultados**

Los resultados de los análisis de laboratorio serán almacenados por los investigadores principales en registros de papel y electrónico. No será identificado por su nombre en estos registros. Sus resultados sólo serán rotulados con un número de código. Esto es para proteger su privacidad. Sus resultados serán guardados tanto tiempo como sea necesario.

Sólo las siguientes personas pueden conocer los resultados de sus análisis:

- i. el Bioq. Raul F Venezuela, Od. Ángel Talavera, Med. María Sollazzo, Od. Ramiro Tomasi, Dr. René Panico, Dra. Cecilia Cuffini y Dra Ruth Ferreyra de Prato
- ii. Los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) (aquellos que revisan la conducción de estudios de investigación en seres humanos).

Los resultados de las muestras pueden ser publicados o agregados a bases de datos públicas. También pueden ser discutidos, analizados y publicados en reuniones públicas. Ninguna presentación o publicación identificará su nombre. Los resultados del estudio están protegidos de acuerdo a lo previsto en las “Pautas internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos” de la Organización de la Salud, en la ley Nacional 25326 de Protección de Datos Personales.

Se le informa que la presente investigación se realizará conforme los criterios éticos de declaración de Helsinki y sus modificaciones.

## **IV. Almacenamiento del Consentimiento Informado**

Los Investigadores principales guardarán su formulario de consentimiento informado de detección de VPH en cavidad oral. Las personas que tienen acceso a su Historia Clínica no sabrán que participó en un estudio de investigación al mirarla. Pueden revisar su consentimiento informado las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS), investigadores principales y colaboradores. Se le entregará una copia de su formulario de consentimiento informado firmado.

### ¿QUÉ SUCEDE SI LUEGO DECIDO RETIRARME DEL ESTUDIO?

Su participación en el estudio es voluntaria y opcional. Si cambia de parecer o decide que no quiere seguir participando, puede pedir la destrucción de su muestra de cepillado de la cavidad oral a los Investigadores Principales. Cualquier resultado de los análisis ya realizados no será borrado. Esto es para proteger la calidad de la investigación. Si decide retirar su participación en esta investigación no afectará la atención y/o tratamiento que estuviera recibiendo, ni causará ninguna sanción o pérdida de los beneficios a los cuales tuviera derecho.

### ¿OBTENDRÉ MIS RESULTADOS DE LABORATORIO?

El resultado del estudio de detección de VPH, en su muestra de cepillado de la cavidad oral, le será informado por los odontólogos de la Facultad de Odontología UNC. Los resultados de los exámenes no serán utilizados para otro fin más que el expuesto. Sin embargo, los odontólogos de la Facultad de Odontología UNC, no tienen control sobre la privacidad de su resultado una vez que se le entregue.

### ¿CUÁLES SON LOS RIESGOS?

Debido a que en el presente estudio se determinará la presencia del VPH, a partir de la muestra tomada para el diagnóstico histopatológico, este estudio no supone toma de muestra adicional, no existiendo riesgo colateral alguno para el paciente.

### ¿SE ME PAGARÁ POR PARTICIPAR O POR EL USO DE MIS RESULTADOS?

No se le pagará por participar en el estudio de detección de VPH en muestras de cavidad oral. No se le pagará por ningún uso de su muestra de cepillado de la cavidad oral. Si participa, está proporcionando su muestra de cepillado de la cavidad oral para ser usada por los investigadores principales.

### CONTACTOS PARA PREGUNTAS

Ante cualquier consulta los participantes de este estudio podrán comunicarse con el **Bioq. Esp. En Virol. Raúl F Venezuela**, Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gomez s/n. Ciudad Universitaria. CP (5016), Córdoba. **Tel Personal: 0351-153-311267. Tel Lab: 0351 4334022. Dra. Cecilia Cuffini** Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Cs. Médicas, Enfermera Gordillo Gómez s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba, **Tel Lab: 0351-4334022.**

Si tiene alguna pregunta sobre sus derechos como Sujeto de Investigación, por favor comuníquese con el “**Comité CIEIS Oulton-Romagosa**”, Av. Vélez Sarsfield 562, 3º Piso CP (5000), Córdoba, al teléfono 0351-4267792; horario de atención: 14 a 18 hs; Coordinador del Comité: **Dr. Adolfo Facello** Tel Celular **0351-156-645775**, y Sub-Coordinadora del Comité: **Dr. Néstor Soria** (si aplica).

Yo....., declaro: haber leído y comprendido las hojas de información; haber podido hacer cualquier pregunta libremente, haber recibido suficiente información, haber sido informado por un investigador cuyo nombre y apellido se hace constar, haber comprendido de mi participación voluntaria; haber comprendido que puedo retirarme libremente sin perjuicio, por lo que doy mi consentimiento para participar en el estudio titulado: **“Detección del Papilomavirus Humano (VPH) en Lesiones de la Cavidad Oral: Comparación con otros Factores de Riesgo”** que se realiza en el Laboratorio de Clamidas y HPV del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Los responsables de este proyecto son Bioq. Esp. En Virología. Raúl F VENEZUELA, Od. Angel TALAVERA, Dra. Ruth FERREYRA de PRATO, Dr. René PANICO y Dra. Cecilia CUFFINI

\_\_\_\_\_

**Firma del Individuo**

\_\_\_\_\_

Aclaración del Nombre del Individuo

\_\_\_\_\_

Nº de DNI

\_\_/\_\_/\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

**Firma del Testigo o Representante Legal**

(si aplica)

\_\_\_\_\_

Nº de DNI

\_\_\_\_\_

Aclaración del Nombre del Testigo o Representante Legal

(si aplica)

\_\_/\_\_/\_\_\_\_

Fecha

**Relación que tiene con el sujeto:**

\_\_\_\_\_

Confirmando que el Individuo arriba firmante recibió la información necesaria para el Consentimiento Informado, la cual le fue explicada en mi presencia.

\_\_\_\_\_

**Firma de la persona que obtiene el Consentimiento informado**

\_\_\_\_\_

Nº de DNI

\_\_\_\_\_

Aclaración de la persona que obtiene el consentimiento informado

\_\_/\_\_/\_\_

Fecha

Declaro haber recibido una copia del consentimiento: FIRMA: .....

## Anexo III: Publicación

JOURNAL OF ORAL MICROBIOLOGY  
2019, VOL. 11, 1632129  
<https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1632129>



OPEN ACCESS Check for updates

### Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: Human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and Herpes simplex virus

Jessica P. Mosmann<sup>a,b</sup>, Angel D. Talavera<sup>c</sup>, María I. Criscuolo<sup>c</sup>, Raúl F. Venezuela<sup>a</sup>, Ana X. Kiguren<sup>a</sup>, Rene Panico<sup>c</sup>, Ruth Ferreyra De Prato<sup>c</sup>, Silvia A. López De Blanc<sup>c</sup>, Viviana ré<sup>a,b</sup> and Cecilia G. Cuffini<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; <sup>b</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina; <sup>c</sup>Cátedra de Estomatología, Facultad de Odontología- Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

#### ABSTRACT

**Objective:** Provide evidence of HPV, *C. trachomatis*, and HSV infection in the oral cavity from patients with different types of stomatological lesions.

**Materials and Methods:** Oral swabs samples were collected from a total of 318 patients. The infectious agents were analyzed using the PCR technique. HPV genotyping and HSV type were studied using the RFLP method.

**Results:** We studied 137 benign lesions (B), 96 potentially malignant disorders (PMD) and 85 oral squamous cell carcinomas (OSCC). The prevalence of HPV was 34%. The most frequently genotypes detected were 6 low risk and 16 high risk. The prevalence of *C. trachomatis* was 16% and HSV 3%. Co-infections were detected mostly in benign lesions as following: HPV-*C. trachomatis* in 4%, *C. trachomatis*- HSV in 1.8% and HPV-HSV in 0.3%.

**Conclusion:** This report is the first contribution to the identification and genotype characterization of HPV in a scenario little studied in our area, and it also contributes to improving our understanding on sexually transmitted infectious agents and their associations with the oral cavity. Besides, we detect the presence of *C. trachomatis* and HSV and co-infection with HPV in the oral cavity, which they should be taken into account for diagnostic and treatment purposes.

#### ARTICLE HISTORY

Received 21 May 2019  
Accepted 10 June 2019

#### KEYWORDS

Oral cavity; Human papillomavirus; *Chlamydia trachomatis*; Herpes simplex virus; sexually transmitted infections; benign lesions; potentially malignant disorders; oral squamous cell carcinoma

#### Introduction

Human Papillomavirus (HPV) is one of the most frequent sexually transmitted infections (STIs) that could play a role in the pathogenesis of head and neck cancer. This infection is a major health problem worldwide that manifests as progressive squamous dysplasia and results from cumulative genetic and epigenetic alterations induced by exposure to carcinogenic agents [1,2].

Despite the well-established role of HPV in cervical cancer, new lines of evidence suggest that HPV may also be an independent risk factor for oral cancer [3], and co-infection with other STI could increase the risk for cancer. Many factors are associated with HPV infection, such as tobacco, alcohol, steroid hormones, UV, bacterial and viral infections [4].

There is evidence that *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) infection could act as a co-factor which facilitates HPV infection and contributes to the viral persistence, increasing the risk of developing cervical neoplasia [5]. *C. trachomatis* is a gram-negative obligate intracellular bacterium with a biphasic development that often remains asymptomatic and can infect genital and oral mucosa [6,7]. In a meta-analysis study,

Zhu et al. [8] reported that individuals infected with *C. trachomatis* have a higher risk of developing cervical cancer.

On the other hand, Herpes simplex virus (HSV) in conjunction with HPV infection may increase the risk of cervical cancer [4]. HSV is an epitheliotropic human pathogen which establishes latency in the sensory ganglia, and it can be reactivated in response to stress, causing secondary infection in oral epithelial cells. Just like HPV infection, published data demonstrates that HSV co-infection with *C. trachomatis* could induce chlamydial persistence [9,10].

The aim of this work was to provide evidence of HPV, *C. trachomatis* and HSV infection in oral cavity samples collected from patients from the central region of Argentina with different types of stomatological lesions.

#### Materials and methods

##### Study population and sampling

Oral swabs samples from a total of 318 patients over 18 years were clinically evaluated in the Department of Stomatology-Faculty of Dentistry-National University

**CONTACT** Jessica P. Mosmann [jessica.mosmann@unc.edu.ar](mailto:jessica.mosmann@unc.edu.ar) Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

of Córdoba–Argentina. Samples were obtained of oral lesions which were classified by specialized stomatologist and confirmed by histopathological study, according to three types: benign lesions (B), potentially malignant disorders (PMDs) and oral squamous cell carcinoma (OSCC).

**Ethical approval**

This study was approved by the Institutional Committee of Ethics of Health ‘Oulton Romagosa’ (RePIS 007) of Córdoba- Argentina, according to the ethical principles stated in the declaration of Helsinki.

**DNA extraction and HPV, C. trachomatis, HSV detection**

Viral and bacterial DNA was extracted using the commercial AccuPrepGenomic DNA Extraction Kit-Bioneer, following the manufacturer’s instructions. Then, HPV L1 genomic region (450 bp) was amplified with degenerate primers MY09 and MY11 following the protocol previously described by Manos et al. [11]. HPV-DNA positive samples were typed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, using seven different restriction enzymes (BamHI, DdeI, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI, and Sau3AIII) [12]. *C.trachomatis* was detected using CTP1 and CTP2 primers to cryptic plasmid obtained amplicons size of 201 bp [13]. We used a PCR with B3/B4 primer set designed to amplify a genomic fragment of highly conserved and divergent DNA sequences in the gene encoding the glycoprotein B (Gb) of primate  $\alpha$ -herpesvirus. Then, RFLP with HaeIII restriction enzyme was used to differential identification of HSV-1 (555 bp) and HSV -2 (561 bp) [14].

The PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel using a UV transilluminator. The  $\beta$ -globin gene was used as a DNA preservation marker.

**Statistical analysis**

Results were analyzed using Chi-square ( $X^2$ ) and Fisher Exact with a significance level 5% (95% CI), Epi info™ CDC software.

**Results**

We evaluated a total of 318 patients, 169 females, and 149 males, aged between 20 and 88 years (mean 55). Of these, 137 were classified among benign lesions (B), 96 potentially malignant disorders (PMDs) and 85 oral squamous cell carcinomas (OSCC). Positivity of DNA-HPV was observed in 34.3% (109/318) (Table 1). It was possible to identify HPV genotypes in 66.9% (73/109): that were showed low risk (LR) genotypes (6, 11, 13, 40, 84) in 63.0% (46/73) of the cases and high risk (HR) genotypes (16, 31, 33) in

Table 1. Percentage of STI according to sex and lesion.

	Total N = 318 (100%)			HPV DNA positive n = 109 (34%)			C. trachomatis DNA positive n = 54 (17%)			HSV DNA positive n = 10 (3%)			
	n	(%)		n	(%)	p value	OR	IC (95%)	n	(%)	p value	OR	IC (95%)
Sex													
Male	149	46.9		50	45.9	0.89	1.06	(0.66–1.68)	27	50	0.71	0.85	(0.47–1.54)
Female	169	53.1		59	54.1				27	50			
Lesion													
B	137	43.1		39	35.8	0.07	1.58	(0.98–2.55)	27	50	0.32	0.71	(0.39–1.28)
PMD	96	30.2		34	31.2				18	33.3			
OSCC	85	26.7		36	33				9	16.7			

B: benign lesion; PMD: potentially malignant disorders; OSCC: oral squamous cell carcinoma.

37% (27/73). In 22% (16/73) of the cases, LR-HR co-infections were detected (Table 2). According to the category of the lesion, HR genotypes detection increased while the progression of the injury was worse. Thus, HR genotype was detected in 26.1%, 38.5%, and 46.8% of B, PMDs, and OSCC, respectively. Globally, the most frequent genotypes detected were 6 (LR) and 16 (HR). But genotypes LR: 11, 13, 40, 84 and HR: 31, 33 and 53 (intermediate risk) were detected. It is important to remark that genotype 53 was detected only in PMDs and OSCC lesions and co-infections with genotype 16 (Figure 1).

The prevalence of *C. trachomatis* was 16.9% (54/318) and for HSV was 3% (10/318) (Table 1). HSV 1 and 2 were detected in 7 and 3 samples, respectively. Out of 10 HSV positive, 8 samples were B lesion and 6 were *C. trachomatis* co-infection (Table 3).

There were no statistically significant differences in DNA of HPV and *C. trachomatis* detection by sex, age and type of oral lesion ( $p > 0.05$ ), although the presence of HSV was significantly associated to sex and type of lesion variables ( $p = 0.02$ ) (Table 1).

Globally, more frequent co-infection was HPV-*C. trachomatis* (4%), followed by *C. trachomatis*- HSV (1.8%), finally HPV-HSV co-infection was 0.3%. In most of the co-infections, HPV LR genotypes were detected (Table 4). One female patient had a triple infection in a benign lesion with LR HPV genotypes.

## Discussion

Despite the fact that oral transmission of HPV is unclear, different sexual habits, such as the onset of sexual activity at an earlier age, an increase in the number of partners, and orogenital sex have made HPV an endemic infection [2]. As a result, some studies have shown the role of viruses in head and neck cancer [15–17].

Since the histology of oral mucosa resembles that of the uterine cervix, we can anticipate the presence of HPV and other STI which are detected in different lesions of genital areas and the oral mucosa. It is estimated that most of the adults who are sexually active, have been exposed to HPV at any anatomical site [18].

Co-infection with two or more pathogens may be an important cofactor for initiation and/or progression of the oncogenic transformation of epithelial cells of the oral mucosa [17]. Several infectious agents may cause a latent infection, and it is well known that pathogenic infections are necessary, but not sufficient for cancer [19].

HPV was reported in several benign oral lesions, especially verruca vulgaris, squamous papilloma, and the rare focal epithelial hyperplasia [2]. Malignant

**Table 2.** Characteristics of HPV genotyped samples (n = 73).

SEX	LESION	HPV GENOTYPE	GENOTYPE RISK	<i>C. trachomatis</i>	HSV
F	B	6	LR	-	-
M	B	6 and 11	LR	-	-
M	B	11	LR	-	-
M	B	11	LR	-	-
M	B	6	LR	-	-
M	B	6 and 11	LR	+	-
M	B	11	LR	-	-
F	B	11	LR	-	-
M	B	6 and 11	LR	-	-
M	B	6	LR	-	-
M	B	40	LR	-	-
F	B	13	LR	+	-
F	B	6	LR	-	-
F	B	6 and 13	LR	+	+
F	B	6	LR	+	-
M	B	11	LR	-	-
M	B	6	LR	-	-
F	B	16	HR	-	-
F	B	31	HR	-	-
F	B	31	HR	-	-
F	B	16	HR	-	-
F	B	31	HR	-	-
F	B	16 and 11	HR	+	-
M	PMD	6 and 11	LR	-	-
F	PMD	11	LR	-	-
F	PMD	6	LR	-	-
M	PMD	6 and 11	LR	-	-
F	PMD	6	LR	-	-
M	PMD	6	LR	-	-
F	PMD	6	LR	-	-
F	PMD	6	LR	-	-
M	PMD	84	LR	-	-
M	PMD	6	LR	-	-
M	PMD	11	LR	-	-
M	PMD	11	LR	-	-
F	PMD	11	LR	+	-
F	PMD	11	LR	-	-
M	PMD	6	LR	-	-
F	PMD	84	LR	+	-
F	PMD	16 and 53	HR	-	-
F	PMD	31	HR	-	-
F	PMD	53	HR	-	-
F	PMD	16	HR	-	-
M	PMD	11 and 16	HR	+	-
F	PMD	16	HR	-	-
F	PMD	16	HR	-	-
F	PMD	16	HR	-	-
F	PMD	31	HR	-	-
F	PMD	31	HR	-	-
M	OSCC	11	LR	-	-
M	OSCC	11 and 6	LR	-	-
M	OSCC	6 and 11	LR	-	-
M	OSCC	6	LR	-	-
M	OSCC	11	LR	-	-
M	OSCC	6	LR	+	-
M	OSCC	6	LR	+	-
M	OSCC	11	LR	+	-
M	OSCC	6	LR	-	-
F	OSCC	11	LR	-	-
M	OSCC	6 and 11	LR	-	-
F	OSCC	6	LR	-	-
M	OSCC	11 and 6	LR	-	-
M	OSCC	16	HR	-	-
M	OSCC	6 and 16	HR	-	-
F	OSCC	33	HR	-	-
M	OSCC	16	HR	-	-
F	OSCC	16	HR	-	-
F	OSCC	16	HR	-	-
F	OSCC	16 and 53	HR	-	-
M	OSCC	31	HR	-	-
F	OSCC	53	HR	-	-
M	OSCC	16	HR	-	-
F	OSCC	6, 16 and 53	HR	-	-

**B:** benign lesion, **PMD:** potentially malignant disorders; **OSCC:** oral squamous cell carcinoma.

**HR:** high risk; **LR:** low risk

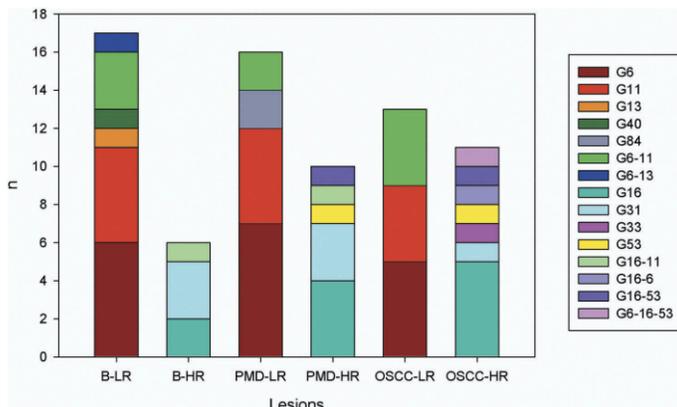


Figure 1. HPV genotypes according to lesions.

**G:** genotype **B-LR:** benign lesion-low risk genotype, **B-HR:** benign lesion-high risk genotype, **PMD-LR:** potentially malignant disorder-low risk genotype, **PMD-HR:** potentially malignant disorder-high risk genotype, **OSCC-LR:** oral squamous cell carcinoma-low risk genotype, **OSCC-HR:** oral squamous cell carcinoma-high risk genotype.

Table 3. Characteristics of HSV positive patients (n = 10).

HSV TYPE	SEX	LESION	HPV/GENOTYPE/RISK	<i>C. trachomatis</i>
1	F	B	-	+
1	F	B	-	+
1	F	B	-	-
1	F	B	-	-
1	F	B	-	+
*2	F	B	+/-6-13/LR	+
2	F	B	-	-
2	F	B	-	-
1	F	PMD	-	+
1	M	OSCC	-	+

**B:** benign lesion, **PMD:** potentially malignant disorders; **OSCC:** oral squamous cell carcinoma.

**HR:** high risk; **LR:** low risk.

\*Female patient with triple infection (HPV, *C. trachomatis* and HSV).

transformation, OSCC, presents different clinical aspects related to the location of the tumor, precancerous lesions and risk factors [20].

In the present study, the prevalence of HPV in oral cavity lesions was 34%. Similar frequency of HPV detection was reported by Syrjänen et al. [21] in a Finland population showing an oral prevalence of 15–30% among couples during the 6-year follow-up.

A lower but significantly different prevalence of oral HPV in oral lesions was found among Croatian individuals (17%) and Chilean patients (11%) with oral cancer [22,23]. However, in a Brazilian study, it was found the highest prevalence of oral lesions from South America (81%) [24].

Two studies which evaluated oral HPV have been conducted in Buenos Aires, Argentina. These studies found a prevalence rate from 30% to 55%, represented mainly by HPV genotypes 6, 11, and 16 [25,26]. In recent years, the relationship between HPV and the OSCC with the dominance of HPV-16 and -18 genotypes has been reported in Mexico [1]; however, in the present study, the HPV-18 was not detected. In this sense, Syrjänen et al. [3] reported that HPV-16 infection was almost 13 times more frequent in SCC oropharynx and 4 times more frequent in OSCC than in healthy mucous membranes. Similar to our findings, Mravak-Stopetic et al. [22] reported that in a Croatian population, it was found the highest prevalence of high-risk HPV types in PMDs. In addition, we detected genotype 53 in

Table 4. STI co-infections in oral samples from 318 Argentinean patients.

		Total		Co infection HPV- <i>C. trachomatis</i>		Co infection HPV-HSV		Co infection ( <i>C. trachomatis</i> -HSV)	
		N = 318 (100%)		N = 13 (4%)		N = 1 (0.3%)		N = 6 (1.8%)	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Sex	<b>Male</b>	149	46.9	6	46.2	0	0	1	16.7
	<b>Female</b>	169	53.1	7	53.8	1	100	5	83.3
Lesion	<b>B</b>	137	43.1	6	46.1	1	100	4	66.6
	<b>PMD</b>	96	30.2	4	30.8	0	0	1	16.7
	<b>OSCC</b>	85	26.7	3	23.1	0	0	1	16.7
HPV genotype	<b>HR</b>			2	15.4	0	0		
	<b>LR</b>			9	69.2	1	100		
risk	<b>W/G</b>			2	15.4	0	0		

**B:** benign lesion, **PMD:** potentially malignant disorders; **OSCC:** oral squamous cell carcinoma.

**HR:** high risk; **LR:** low risk; **W/G:** without genotype detected.

PMDs and OSCC lesions, which is proposed as a type that is probably carcinogenic because of their close phylogenetic relationship with the established carcinogenic types, highlighting the need for continuous control and treatment of these lesions [27].

On the other hand, HPV DNA in asymptomatic infections in which HPV DNA is detectable without any clinical lesion is still a matter of debate. Kreimer et al. [28] reported that asymptomatic oral HPV-16 infection and any HPV type were found in 1.3% and 4.5%, respectively, of the nearly 4,000 subjects included in the review [21]. In a previous local study, HPV in oral mucosa without lesion or injury was not detected [29], maybe because the number of healthy volunteers who were studied was small. Likewise, in a study conducted in the same region among randomly selected healthy subjects, HPV was detected in 3% (13/401) of the cases, and all the identified genotypes were low risk. Most of them exhibited some lesions related to chronic mechanical irritation, and no clinical manifestations suggestive of HPV infection were found in any of the HPV positive subjects [30]. However, oral HPV prevalence range is very wide, and it is influenced by the demographic and ethnic differences of the populations investigated, as well as the different diagnostic procedures [2].

*Chlamydia trachomatis* co-infection is considered to be a possible co-factor that may lead from infection to oncogenesis. Positive associations have been observed between *C. trachomatis* infection and squamous cell carcinoma of the cervix or its precursor lesions in most of the epidemiological studies that detect HPV infection [31]. Indeed, *C. trachomatis* infection can alter the normal structure of epithelial cell junctions, increasing susceptibility to HPV infection both in the genital and oral mucosa. A possible biological explanation for the increased risk for co-infection is that Chlamydia causes local inflammation leading to damage of the epithelial tissue which in turn could become more susceptible to other infections [32].

The frequency of *C. trachomatis* in the oral cavity varies widely among published studies. This variability can be explained by the varied biological samples collected in the different studies (pharyngeal swab, spittle oral wash fluid, and oral lesion samples, etc.), the lack of global standardization techniques used for *C. trachomatis* detection and the diversity of population study groups (men, women, men who have sex with men (MSM), female sex workers, etc.). As a result, it is difficult to make a direct comparison between those studies. Thus, our results show 16% and 18% of *C. trachomatis* DNA positive in oral lesions from women and men, respectively. These frequencies were higher than those in spittle samples among Japanese men (4.2%) [33], in oral wash fluid

(3–10%) and in pharyngeal swab (6%) [34]. In addition, in a study conducted in the Netherlands, pharyngeal chlamydia was detected in 1.1% in MSM and in 2.3% among women [35].

However, in a Japanese population of female sex workers, *C. trachomatis* was detected in 44% of pharyngeal swabs and in 61% of oral wash fluid samples [34].

A limitation of this study is that the collected data do not provide us with information concerning the sexual behavior of patients.

With respect to HSV, it has been described that direct contact with lesions or with infected oral or genital secretions during asymptomatic shedding can be a transmission way of the virus [36]. Thus, HSV oral and genital infections may predispose people to HPV infection. Possible mechanisms include HSV infection which enables HPV better access to the basal cell layer, allowing for the establishment of infection [37]. A recent study showed that oral carcinomas co-infected with HPV-16 and HSV-1 had the least favorable outcome, suggesting that HSV-1 infection increases radiation resistance of HPV-16 infected by evasion of apoptosis [38].

Based on this information, we consider it important to study HSV and co-infections with other STIs, which is the aim of the present study. Although a high frequency of HSV in the oral cavity would be expected, in this study the frequency observed was low. This could be due to the fact that lesions directly associated with HSV were not studied, since the biosecurity protocol of dentists does not allow it. In case of visible herpetic injuries, the patients received antiviral treatment and when the treatment is finished, a new sample is taken.

Our study detected HSV DNA in 3% of the cases, represented primarily by HSV-1 (2%) followed by HSV-2 (1%). Most of these were benign lesions and female patients. These results are in agreement with a study carried out in the USA among individuals with HSV-1 and HSV-2 antibody [39] in which isolated oral HSV-2 is less frequent than oral HSV-1 (0.06% and 1%, respectively).

Globally, reports show that the frequency of HSV positivity varies according to the population and type of sample used. Thus, some studies report that HSV-1 was detected in 36% of the oral leukoplakia samples (PMD), and in 52% of the OSCC samples among Sweden patients [40]. Similar to our findings, a previous study in Finland found that only 3% and 2.8% of the asymptomatic female and male were HSV-1 positive in their oral mucosal brush samples, respectively. In addition, this study showed that HSV-1 and HPV co-infection in oral mucosa of young women was rare (0.2%) [38]. In this sense, in our study, we detected only 0.3% of this co-infection (HSV-1 and HPV) and the most frequent co-infection was HSV-*C. trachomatis* (4%).

In the literature, studies of sexually transmitted viruses in lesions of the oral cavity have usually been confined to the search for HPV, so little is known about the presence and co-infection with other infectious agents such as *C. trachomatis* and HSV. The current findings confirm that our knowledge on the variety of infectious agents in the oral cavity is only partial.

In this study, the three studied agents were found in all lesion type regardless of the sex of the patients; therefore, they should be taken into account for diagnostic, treatment purposes, and their epidemiological importance should be considered.

This report is the first contribution to the identification and genotype characterization of HPV in a scenario little studied in our area, and it also contributes to improving our understanding on sexually transmitted infectious agents and their associations with the oral cavity.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by PODO 2017; PIO-Mincyt Cba N°170/2011; Fundación Alberto Roemmers and SeCyT-UNC 2014/21.

### ORCID

Jessica P. Mosmann  <http://orcid.org/0000-0002-0839-6324>

### References

- [1] de la Fuente Hernández J, Muñoz Mujica P, Patrón Bolaños P, et al. Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas. *Salud (i) ciencia (Impresa)*. 2014;20: 636–642.
- [2] Candotto V, Lauritano D, Nardone M, et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol*. 2017;10:209–220.
- [3] Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol*. 2003;192:123–128.
- [4] Szostek S, Zawilińska B, Biernat-Sudolska M, et al. Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or Ureaplasmas. *Folia Biol*. 2014;62:73–78.
- [5] Nonato D, Alves R, Ribeiro A, et al. Prevalence and factors associated with coinfection of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in adolescents and young women. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:e1–e753.
- [6] Sherchand S, Ibana J, Zea A, et al. The high-risk human papillomavirus E6 oncogene exacerbates the negative effect of tryptophan starvation on the development of *chlamydia trachomatis*. *PLoS ONE*. 2016;11:e0163174.
- [7] Madeleine M, Antilla T, Schwartz S, et al. Risk of cervical cancer associated with *chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer*. 2006;120:650–655.
- [8] Zhu H, Shen Z, Luo H, et al. *Chlamydia trachomatis* infection- associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e3077.
- [9] Deka S, Vanover J, Sun J, et al. An early event in the herpes simplex virus type-2 replication cycle is sufficient to induce *Chlamydia trachomatis* persistence. *Cell Microbiol*. 2007;9:725–737.
- [10] Vanover J, Kintner J, Whittimore J, et al. Interaction of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein D with the host cell surface is sufficient to induce *Chlamydia trachomatis* persistence. *Microbiology*. 2010;156:1294–1302.
- [11] Manos M, Ting Y, Wright D, et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells*. 1989;7:209–214.
- [12] Bernad H, Chan S, Manos M, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequences and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*. 1994;170:1077–1085.
- [13] Lan J, Walboomers J, Roosendaal R, et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1060–1065.
- [14] Black D, Eberle R. Detection and differentiation of primate alpha-herpesviruses by PCR. *J Vet Diagn Invest*. 1997;9:225–231.
- [15] Metgud R, Astekar M, Verma M, et al. Role of viruses in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rev*. 2012;6:164–170.
- [16] Benson E, Li R, Eisele D, et al. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2014;50:565–574.
- [17] Drop B, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, et al. Coinfection with Epstein–barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in laryngeal, oropharyngeal and oral cavity cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2752–2764.
- [18] Sun C, Bennett N, Tran P, et al. A pilot study into the association between oral health status and human papillomavirus—16 infection. *Diagn*. 2017;7:11–20.
- [19] Rautava J, Willberg J, Louvanto K, et al. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: A six-year follow-up study. *PLoS ONE*. 2012;7:e42171.
- [20] Aguas S, Lanfranchi H. Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. *Revista De La Facultad De Odontología (UBA)*. 2004;19:21–30.
- [21] Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci*. 2018;126:49–66.
- [22] Mravak-Stipetić M, Sabol I, Kranjčić J, et al. Human papillomavirus in the lesions of the oral mucosa according to topography. *PLoS One*. 2013;8:e69736.
- [23] Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Pennacchiotti G, et al. Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients. *Exp Mol Pathol*. 2015;99:95–99.
- [24] Ribeiro M, Marcolino L, Ramos B, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral mucosal lesions of patients at the ambulatory of oral diagnosis of the federal university of Sergipe, Northeastern Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2017;25:69–74.

- [25] Gonzalez J, Gutierrez R, Keszler A, et al. Human Papillomavirus in oral lesions. *Medicina (B Aires)*. 2007;67:363–368.
- [26] Gutierrez R, Colacino M, Picconi M, et al. Detection and typing of HPV in oral lesions. *Dermatol Argent*. 2006;2:114–119.
- [27] Kreimer A, Bhatia R, Messegue A, et al. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*. 2010;37:386–391.
- [28] Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30S:55–70.
- [29] Venezuela R, Talavera A, Frutos M, et al. Human Papillomavirus (HPV) in oral cavity lesions: comparison with other oral cancer risk factors. *J Microbiol Res*. 2013;3:228–233.
- [30] Crisculo M, Belardinelli P, Morelato R, et al. Prevalence of oral human papillomavirus (HPV) in the adult population of Córdoba, Argentina. *Transl Res Oral Oncol*. 2018;3:1–8.
- [31] Jenkins W, Levault K, Sutcliffe S. *Chlamydia trachomatis* infection: possible co-factor for oropharyngeal cancer development? *Oral Oncol*. 2015;51:8–9.
- [32] Vriend H, Boggards J, Van Bergen J, et al. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young woman with or without *Chlamydia trachomatis* co-infection. *Cancer Med*. 2015;4:1589–1598.
- [33] Nakashima K, Shigehara K, Kawaguchi S, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma spp.*, and *Ureaplasma spp.* *BMC Infect Dis*. 2014;14:43–50.
- [34] Hamsuna R, Hoshina S, Imai H, et al. Usefulness of oral wash specimens for detecting *Chlamydia trachomatis* from high-risk groups in Japan. *Int J Urol*. 2007;14:473–475.
- [35] Van Rooijen S, Van Der Loeff M, Morré S, et al. Spontaneous pharyngeal *Chlamydia trachomatis* RNA clearance. A cross-sectional study followed by a cohort study of untreated STI clinic patients in Amsterdam, The Netherlands. *Sex Transm Infect*. 2015;91:157–164.
- [36] Ramchandani M, Kong M, Tronstein E, et al. Herpes simplex virus type 1 shedding in tears and nasal and oral mucosa of healthy adults. *Sex Transm Dis*. 2016;43:756–760.
- [37] Guidry J, Scott R. The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Res*. 2017;231:139–147.
- [38] Mäki J, Paavilainen H, Kero K, et al. Herpes simplex and human papilloma virus coinfections in oral mucosa of men—a 6-year follow-up study. *J Med Virol*. 2018;90:564–570.
- [39] Wald A, Ericsson M, Krantz E, et al. Oral shedding of herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Infect*. 2004;80:272–276.
- [40] Jalouli M, Jalouli J, Hasséus B, et al. Nested PCR for detection of HSV- 1 in oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e664–e9.