



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
TRABAJO DE FIN DE GRADO DE ODONTOLOGÍA

TÍTULO DEL TFG: Expresión inmunohistoquímica mediante doble coloración p16/ki67 para determinar virus del papiloma humano (VPH) en lesiones orales.

AUTOR: Alicia Santamaría González

TUTOR/A: Mario Pérez-Sayáns García

COTUTOR/A: Pilar Gándara Vila

Departamento: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas. Unidad docente de Medicina Oral.

Curso académico: 2020-2021

Convocatoria: Segunda

RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tumor maligno más prevalente en la cavidad oral y cuya asociación con el virus del papiloma humano (VPH) es importante. La presencia del VPH se ha asociado con liquen plano oral, displasia epitelial y leucoplasia oral. Se ha observado que las infecciones oncogénicas provocadas por VPH se relacionan con la expresión de moléculas celulares: p16 y Ki67. Se ha propuesto que estas moléculas puedan usarse como biomarcadores de lesión o de progresión. Hemos probado la presencia de ADN del VPH en biopsias de leucoplasias orales para evaluar su papel en el desarrollo del cáncer oral para estudiar las ventajas que pueden mostrar p16 y Ki67 a la hora de evaluar un diagnóstico.

Objetivos: Asociar la expresividad de p16 y Ki67 con la presencia del VPH y asociar la expresión de p16 y Ki67 con variables clínicas específicas y el desarrollo de VPH.

Material y métodos: Se recolectaron de manera retrospectiva aquellos datos con diagnóstico de leucoplasia. Para determinar la presencia de p16 y Ki67 se llevó a cabo la inmunohistoquímica en muestras embebidas en parafina. La presencia del ADN del VPH fue probada usando el sistema CLART® HPV 2. Estadísticamente se analizó mediante el programa SPSS v.24.0 comparando medias y frecuencias con Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis y ANOVA y generando curvas de supervivencia mediante Kaplan-Meier comparando los factores con el estadístico log rank.

Resultados: Se evaluaron 33 muestras de 28 pacientes, en base a las cuales no se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresividad de los marcadores biológicos p16 y Ki67 con la presencia del VPH a nivel de la cavidad oral y tampoco entre la expresividad de p16 y Ki67 respecto a características clínicas específicas.

Conclusiones: No se puede afirmar que exista una relación clara y directa entre los marcadores biológicos p16 y Ki67 y la presencia de VPH oral ni su correlación con características clínicas específicas.

Palabras clave: Inmunohistoquímica, VPH, p16, Ki67, COCE.

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (COCE) is the most prevalent malignant tumor in the oral cavity and whose association with the human papillomavirus (HPV) is important. The presence of HPV has been associated with oral lichen planus, epithelial dysplasia, and oral leukoplakia. Oncogenic infections caused by HPV have been found to be related to the expression of cellular molecules: p16 and Ki67. It has been proposed that these molecules will be used as progression injury biomarkers. We have tested the presence of HPV DNA in oral leukoplakia biopsies to evaluate its role in the development of oral cancer to study the advantages that p16 and Ki67 can show when evaluating a diagnosis.

Objectives: To associate the expressivity of p16 and Ki67 with the presence of HPV and associate the expression of p16 and Ki67 with specific variables and the development of HPV.

Material and methods: Data with a diagnosis of leukoplakia were collected retrospectively. To determine the presence of p16 and Ki67, immunohistochemistry was carried out on paraffin-embedded samples. The presence of HPV DNA was tested using the CLART® HPV 2 system. Statistically, it was analyzed using the SPSS v.24.0 program, comparing means and frequencies with Chi-square, Kruskal-Wallis and ANOVA and generating survival curves using Kaplan-Meier comparing the factors with the log rank statistic.

Results: 33 samples from 28 patients were evaluated, on the basis of which no statistically significant relationship was found between the expressivity of the biological markers p16 and Ki67 with the presence of HPV at the level of the oral cavity and neither between the expressivity of p16 and Ki67 regarding specific clinical characteristics.

Conclusions: It cannot be said that there is a clear and direct relationship between the biological markers p16 and Ki67 and the presence of oral HPV or its correlation with specific clinical characteristics.

Keywords: Immunohistochemistry, HPV, p16, Ki67, COCE.

RESUMO

Introdución: O carcinoma oral de células escamosas (COCE) é o tumor maligno máis prevalente na cavidade oral e cuxa asociación co virus do papiloma humano (VPH) é importante. A presenza do VPH asociouse co liquen plano oral, displasia epitelial e leucoplasia oral. Observouse que as infeccións oncogénicas provocadas por VPH se relacionan coa expresión de moléculas celulares: p16 e Ki67. Propúxose que estas moléculas poidan usarse como biomarcadores de lesión ou de progresión. Probamos a presenza de ADN do VPH en biopsias de leucoplasias orais para avaliar o seu papel no desenvolvemento do cancro oral para estudar as vantaxes que poden mostrar p16 e Ki67 á hora de avaliar un diagnóstico.

Obxectivos: Asociar a expresividade de p16 e Ki67 coa presenza do VPH e asociar a expresión de p16 e Ki67 con variables clínicas específicas e o desenvolvemento de VPH.

Material e métodos: Recolectáronse de maneira retrospectiva aqueles datos con diagnóstico de leucoplasia. Para determinar a presenza de p16 e Ki67 levouse a cabo a inmunohistoquímica en mostras embebidas en parafina. A presenza do ADN do VPH foi probada usando o sistema CLART® HPV 2. Estadísticamente analizouse mediante o programa SPSS v.24.0 comparando medias e frecuencias con Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis e ANOVA e xerando curvas de supervivencia mediante Kaplan-Meier comparando os factores co estadístico log rank.

Resultados: Avaliáronse 33 mostras de 28 pacientes, en base ás cales non se atopou relación estadísticamente significativa entre a expresividade dos marcadores biolóxicos p16 e Ki67 coa presenza do VPH a nivel da cavidade oral e tampouco entre a expresividade de p16 e Ki67 respecto a características clínicas específicas.

Conclusións: Non se pode afirmar que exista unha relación clara e directa entre os marcadores biolóxicos p16 e Ki67 e a presenza de VPH oral nin a súa correlación con características clínicas específicas.

Palabras chave: Inmunohistoquímica, VPH, p16, Ki67, COCE.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	7
1.1.	Carcinoma oral de células escamosas.....	7
1.2	factores de riesgo para el carcinoma oral de células escamosas	7
1.2.1	factores químicos	7
1.2.2	factores biológicos	8
1.2.3	factores asociados a la higiene oral.....	9
1.2.4	factores nutricionales	9
1.2.5	factores asociados a la radiación.....	9
1.3.	Virus del papiloma humano (vph)	10
1.3.1.	Estructura del vph, replicación y tipos de proteínas.	10
1.3.2	técnicas para la detección del vph.....	14
1.3.3	vacunación para el vph	15
1.4-	marcadores inmunohistoquímicos	15
2.	Objetivos.....	17
3.	Material y métodos	18
3.1	pacientes y muestras	18
3.2	análisis de vph.....	18
3.3	análisis inmunohistoquímico de p16 y ki67	19
3.4	variables y datos recogidos	19
3.5	análisis estadístico.....	20
4.	Resultados.....	21
4.1.	Resultados descriptivos de la muestra	21
4.1.1.	Edad y sexo.....	21
4.1.2	comorbilidades.....	21
4.1.3	consumo de alcohol y tabaco.	21
4.1.4	tipo de biopsia y localización.....	22
4.1.5	presentación clínica de los resultados	22
4.1.6	tamaño de la lesión	22
4.1.7	grado de displasia y presencia de carcinoma previo	23
4.1.8.	Evolución clínica y tratamiento recibido	23
4.1.9.	Exitus.....	23
4.2.	Resultados descriptivos en doble tinción, vph, p16 y ki67	23
4.3	resultados analíticos	27

- 5. Discusión 33
- 6. Conclusión 36
- 7. Anexos 37
 - 7.1. Comité ético de investigación de galicia..... 37
- 8. Referencias 40

ABREVIATURAS:

COCE: Carcinoma oral de células escamosas

VPH: Virus del papiloma humano

SEOM: Sociedad española de oncología médica

OSMF: Fibrosis submucosa oral

VEB: Virus Epstein-Barr

HNSCC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humano

PCR: Reacción de la cadena de la polimerasa

HIS: Hibridación insitu

OMS: Organización mundial de la salud

NHC: No historia clínica

1. INTRODUCCIÓN

1.1.CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una de las neoplasias más comunes a nivel de la cavidad oral y representa entorno al 90% de las lesiones de características malignas a nivel oral. Presenta una tasa de supervivencia del 50% a los 5 años (1). Por ello hay que darle una especial importancia a la elaboración de un diagnóstico precoz por parte del odontólogo y para eso es vital una correcta exploración intraoral y extraoral para que este diagnóstico sea lo más precoz y acertado posible influyendo así en la supervivencia y calidad de vida del paciente (2).

En España, haciendo referencia a la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) se puede comprobar que a lo largo del año 2020 se diagnosticaron 8.604 casos de cánceres de cavidad oral y faringe en relación a ambos sexos, es decir entre mujeres y hombres. Si desglosamos estos datos el número de casos de cáncer de cavidad oral y faringe diagnosticados solamente al grupo masculino a lo largo del año fue de 6.049 casos. Respecto al grupo femenino el número de casos diagnosticado a lo largo del 2020 fue de 2.555 casos (3).

Existen ciertos factores de riesgo que actuando sobre una base genética hace que ciertas personas tengan una predisposición determinada para el desarrollo de un cáncer a nivel de la cavidad oral, como lo es el COCE. Los factores de riesgo a destacar son los siguientes:

1.2 FACTORES DE RIESGO PARA EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

1.2.1 FACTORES QUÍMICOS

- **TABACO.** Debido a la composición y a los contaminantes del tabaco, los carcinógenos más importantes en el humo del tabaco son el hidrocarburo aromático benzopireno y las nitrosaminas específicas del tabaco (TSN), 4- (nitrosometilamino) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK) y N'-nitrosornicotina (NNN), se produce un efecto de irritación sobre la mucosa oral dando lugar a cambios o alteraciones sobre el tejido (4). Cabe destacar la fibrosis submucosa (OSMF) la cual supone una condición a nivel de la cavidad oral con un alto potencial de malignización (5). Todas las formas en las que se puede presentar el tabaco conllevan un riesgo para la salud oral, no obstante en ciertos países escandinavos como Suecia es típico el snus que se trata de una mezcla de tabaco picado de manera muy fina y mezclado con agua y sal que no está sometido a un proceso de fermentación y supone un riesgo menor para la salud y por lo tanto para la cavidad oral,

pero esta forma de presentación del tabaco no deja de ser perjudicial para la salud, simplemente supone un riesgo menor (6).

- **ALCOHOL.** Se establece una relación sinérgica evidente entre el consumo de alcohol y tabaco ya que se aumenta el riesgo de desarrollar cáncer oral. Principalmente se debe a que el consumo de alcohol supone un aumento de la permeabilidad de la mucosa oral produciendo atrofia epitelial, dando lugar a que los carcinógenos penetren con mayor facilidad en la mucosa oral (7). Existen una serie de casos donde se reportan pacientes donde el alcohol supone un riesgo independiente para el desarrollo de leucoplasia oral (8). Sin embargo, otros estudios demuestran la relación entre tabaco y alcohol para el desarrollo de una displasia epitelial oral. Por lo que el alcohol como factor independiente en la carcinogénesis oral no está claro, lo que es evidente es el sinergismo entre el alcohol y el tabaco (9).

1.2.2 FACTORES BIOLÓGICOS

- **INFECCIONES VÍRICAS.** Los virus tienen una fuerte relación con el desarrollo de tumores malignos a nivel del epitelio escamoso y por tanto de la cavidad oral. Los virus oncogénicos son aquellos capaces de contribuir a la aparición de tumores específicos que suelen estar implicados en el desarrollo del cáncer oral. Son el virus del herpes humano (principalmente el virus de Epstein-Barr (VEB)), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del herpes simple. Dentro del VPH se pueden diferenciar virus de riesgo elevado y de riesgo bajo (10). Principalmente existen 15 tipos virales de riesgo elevado (oncogénicos), que son aquellos que poseen la capacidad de transformar la célula que infectan a célula tumoral, son los siguientes: VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59. Relacionados principalmente con el cáncer cervicouterino y con la neoplasia intraepitelial cervical. Los virus de bajo riesgo (no oncogénicos) están relacionados con otro tipo de lesiones como el condiloma acuminado, la leucoplasia intraepitelial de bajo grado e infecciones asintomáticas, son los siguientes: VPH-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 78 y 81 (11). El VPH que se detecta con más frecuencia en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) es el VPH-16, que se ha demostrado en el 90-95% de todos los casos de HNSCC positivos al VPH, seguido de VPH-18, VPH-31 y VPH-33. Es

importante mencionar el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ya que podría explicar el aumento de casos de COCE en jóvenes, por lo que hay un vínculo entre la condición de inmunosupresión crónica provocada por el VIH y la posibilidad del desarrollo de COCE en individuos jóvenes (12). El virus de Epstein Barr (EBV), el herpes virus humano-8 (HHV-8) y el citomegalovirus también se han informado como factores de riesgo de COCE en diferentes estudios (13).

1.2.3 FACTORES ASOCIADOS A LA HIGIENE ORAL

- **SALUD ORAL.** Una mala salud oral combinada con la presencia de piezas dentales deterioradas o en mal estado suponen un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer a nivel de la cavidad oral. Se puede considerar una relación sinérgica entre una mala higiene oral y el tabaco ya que la sepsis oral promueve la acción carcinogénica del tabaco (14).

1.2.4 FACTORES NUTRICIONALES

- **DIETA.** La relación entre la nutrición y el riesgo de desarrollar cáncer ha sido establecida por varios estudios epidemiológicos y de laboratorio. En concreto la ingesta de ciertos alimentos como frutas y verduras frescas se asoció a un menor riesgo de cáncer oral (15). Una mala dieta con predominio de déficits nutricionales puede desarrollar un trastorno llamado síndrome de Paterson-Kelly o síndrome de Pulmmer-Vinson, donde se destaca la presencia de anemia por falta de hierro y la proliferización de una serie de membranas en la garganta que dificulta la acción de tragar. Esta condición combinada con la herencia genética puede aumentar el riesgo de desarrollar COCE de esófago proximal y faringe. Este tipo de síndrome es característico de pacientes con anemia ferropénica crónica (16).

1.2.5 FACTORES ASOCIADOS A LA RADIACIÓN

Existen diferentes tipos de radiaciones: ionizantes y no ionizantes. Dentro de las radiaciones no ionizantes se pueden encontrar las de tipo ultravioleta como la exposición solar, las de tipo infrarrojo, las de tipo electromagnéticas y las de tipo microondas. A nivel de las radiaciones ionizantes se pueden encontrar las de tipo X, radiaciones gamma, partículas alfa, partículas beta y neutrones.

La exposición a las radiaciones de características ionizantes son las que presentan más riesgos en términos de salud, ya que pueden producir mutaciones, enfermedades causadas por radiación aguda, cáncer y muerte (17).

- **RADIACIÓN X.** Este tipo de radiación tiene un gran potencial mutagénico y la capacidad de penetrar los tejidos biológicos. Los efectos que se producen sobre los tejidos se pueden dividir en estocásticos y reacciones tisulares. El órgano o tejido más afectado de estas radiaciones es la piel y se describen múltiples lesiones asociadas como el eritema transitorio, caída del cabello, úlceras dolorosas profundas y de gran permanencia a lo largo el tiempo y depilación (18).
- **RADIACIÓN SOLAR (ULTRAVIOLETA).** Se produce un fenómeno llamado queilitis actínica a nivel del labio inferior ya que es la zona de mayor incidencia de la radiación ultravioleta, afectando sobre todo a varones con escasa melanina y que se expusieron durante largos periodos de tiempo a este tipo de radiación. La queilitis actínica es un factor de riesgo importante a la hora de desarrollar un carcinoma (19).

Generalmente este tipo de neoplasia es de carácter multifactorial y engloba el impacto de los factores de riesgo que actúan sobre una predisposición genética. Este tipo de carcinoma guarda una importante relación con el virus del papiloma humano (VPH), mencionado anteriormente. El VPH es el responsable de numerosas patologías a nivel de la cavidad oral como las de carácter hiperplásico, papilomatoso y verrucoso (20).

1.3. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del Papiloma Humano (VPH) se trata de un virus que pertenece a la familia de los Papillomaviridae. Este tipo de virus se caracterizan por no estar envueltos con genoma de AND y tener una preferencia por infectar tejido de tipo epitelial (21).

1.3.1. ESTRUCTURA DEL VPH, REPLICACIÓN Y TIPOS DE PROTEÍNAS.

El virus del VPH tiene una morfología icosaédrica con un diámetro aproximado entre 52 nm y 55 nm, la cápside vírica o envoltura proteica está compuesta de unos 72 capsómeros de estructura pentamérica, donde la proteína más abundante es la L1. Dentro de esta cápside se encuentra el genoma del virus, formado por una doble cadena de ADN cuya unión es covalente circularizado (22).

Respecto al genoma del virus es importante señalar que se divide en 3 regiones principales: la región larga de control cuya función es reguladora y no codificante, la región de genes de expresión temprana y la región de genes de expresión tardía (23).

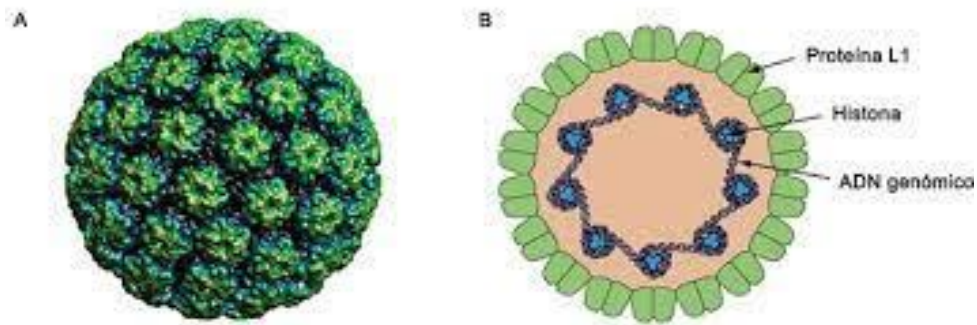


Figura 1. Estructura del VPH. Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, Vol. 53 (2015).

La replicación del virus del papiloma humano (VPH), consiste en la síntesis de nuevas partículas virales se lleva a cabo en células epiteliales escamosas debido a la alta especificidad que muestra el virus respecto a este tipo de células. La entrada del virus en la célula se produce por endocitosis y una vez dentro, el virión se desune y se lleva a cabo la salida del genoma viral, a su vez la proteína L2 migra al núcleo. El genoma una vez en el núcleo es transcrito (24).

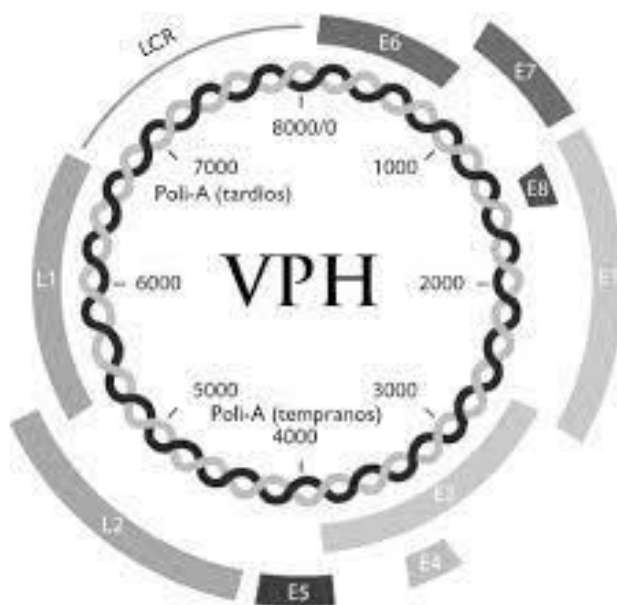


Figura 2: Estructura genómica del VPH. Instituto Nacional de Cancerología

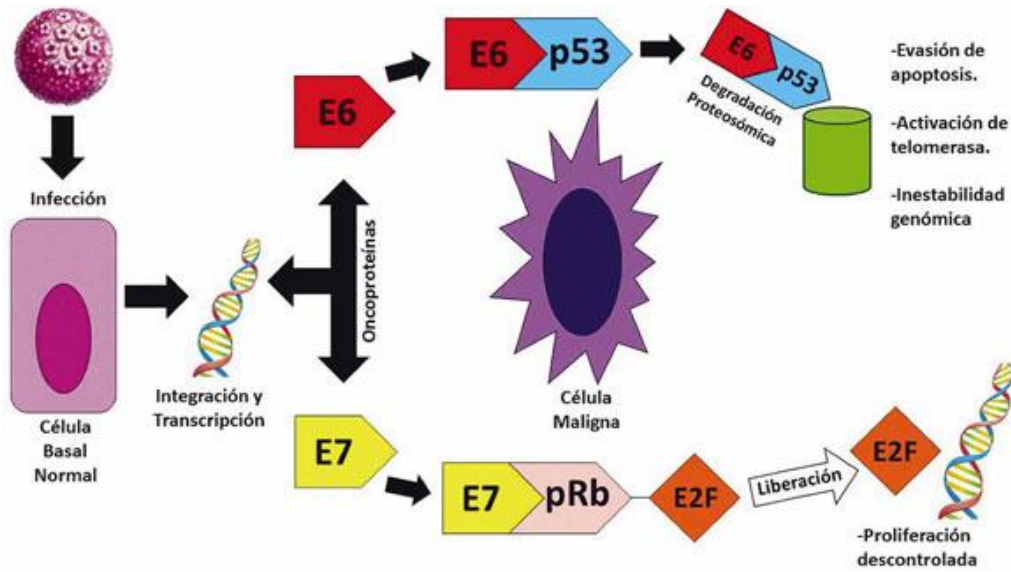


Figura 3: Mecanismo de acción carcinógena del VPH de alto riesgo.

Existen una gran variedad de proteínas dentro del virus del papiloma humano (VPH), estas las podemos dividir en estructurales y no estructurales principalmente, como se ve en la tabla:

PROTEÍNA	NOMBRE	FUNCIONES
	<i>E1</i>	Replicación y transcripción
NO ESTRUCTURALES	E2	Replicación, transcripción, segregación y encapsidación
	E4	Expresión de genes tardíos, maduración del virus y salida del virión
	E5	Inestabilidad cromosómica y aneuploidia debido a la fusión celular. Actividad transformante de E6 y E7.
	E6	Degradación de la proteína p53 (supresora de tumores), persistencia del virus y evasión de la respuesta inmunitaria. Activa la telomerasa.
	E7	Degradación de la proteína pRB (supresora de tumores), evasión de la respuesta inmunitaria, incrementa la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas, interacción con factores de transcripción E2F.

ESTRUCTURALES	L1	Reconoce a los receptores de la célula a infectar. Inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes. Es la proteína esencial de la cápside vírica.
	L2	Unión del virión a la célula. Transporte al núcleo, liberación del genoma, ensamble de viriones. Proteína secundaria de la estructura vírica.

Tabla 1. (José Veríssimo Fernandes, Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes, 2012).

Durante los últimos años este virus se ha convertido en un gran problema de salud debido a la relación con diversos cánceres como pueden ser los de la orofaringe, la zona anogenital y el cuello uterino. El odontólogo juega un papel muy importante ya que un diagnóstico precoz puede evitar que el VPH contribuya al desarrollo de un carcinoma (25).

Respecto a las lesiones orales de características benignas destacan el papiloma bucal, verruga vulgar bucal, condiloma acuminado bucal e hiperplasia epitelial focal (enfermedad de Heck), las lesiones con tendencia maligna más destacables son la leucoplasia y el carcinoma oral de células escamosas (26).

La relación del VPH con el COCE según la localización muestra una clara tendencia a un desarrollo a nivel de la cavidad oral con 12%-71% y en la laringe con un 4%-24%. Además, en tumores orofaríngeos afecta, con una mayor positividad para VPH, a amígdala y base de lengua. El VPH que más capacidad de desarrollar cáncer es el VPH-16 y VPH-18, muestran una gran relación con el carcinoma de células escamosas (COCE) (27).

Se ha visto un aumento considerable en el número de casos de cánceres orofaríngeos, sobre todo en mujeres jóvenes, relacionados con el VPH (28). Además, estos tipos de cáncer son más frecuentes sobre todo en personas jóvenes que no tienen un consumo excesivo o extremo en el consumo tanto de alcohol como de tabaco, o bien, en ambos factores tomados de manera combinada. La infección por VPH se asocia a dos de cada tres cánceres orofaríngeos, y en un porcentaje algo menor en cánceres de cavidad oral. La razón para el aumento en los cánceres relacionados con VPH podría deberse a cambios en las tendencias sexuales de las personas, destacando un aumento de las relaciones sexuales. Por lo tanto, el riesgo de padecer infección por VPH aumenta si se tiene una vida sexual activa y en concreto si se tiene más de una pareja sexual, un consumo excesivo de alcohol y tabaco y por un sistema inmunitario débil (29).

1.3.2 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DEL VPH

Existen diferentes técnicas de detección de HPV orientadas hacia el cérvix o zona uterina, ya que este virus muestra una gran relación con el cáncer de cuello de útero.

- **PRUEBA DE PAPANICOLAU (CITOLOGÍA VAGINAL)**

Se usa para detectar cambios celulares o células anormales en el cuello uterino.

Se analizan las características morfológicas del núcleo, citoplasma y relación núcleo-citoplasma de las células. Esta técnica se basa en la diferenciación escamosa de las células cervicovaginales y las alteraciones morfológicas de las células cuando hay presencia de patología (30).

- **PRUEBA DE DETECCIÓN VPH**

Se trata de relacionar la infección cervical con los tipos de VPH de alto riesgo ya que son los que más posibilidades tienen de evolucionar a lesiones precancerosas y cáncer en el cuello uterino (31).

- **PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)** Sensibilidad y especificidad elevada. La PCR ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias que son de difícil cultivo (32).

- **HIBRIDACIÓN IN SITU EMPLEANDO SONDAS BIOTINALADAS (HIS)** Consiste en el apareamiento de hebras complementarias de ADN. A nivel de análisis molecular es una de las herramientas más importantes y una de las principales ventajas es la especificidad por células individuales de un tejido heterogéneo (33).

El VPH tiene una transmisión por contacto directo y la mayoría de las lesiones de la cavidad oral se producen por contacto directo debido a la autoinoculación y por relaciones urogenitales, a nivel oral las principales técnicas de diagnóstico de VPH (34) son las siguientes:

- **CITOLOGÍA ORAL EXFOLIATIVA.** Estudio celular de la mucosa oral. Se observan las células epiteliales mediante microscopía después de la toma, fijación y tinción de la muestra (35).

En lesiones bucales la citología exfoliativa presenta una elevada sensibilidad, así como elevados valores predictivos tanto positivos como negativos y una eficacia a nivel global.

Se considera un importante método de diagnóstico de características no invasivas a nivel oral (36).

- **BIOPSIA.** Se recomienda una biopsia de tipo excisional, estirpando así toda la lesión para el estudio anatomopatológico posterior (37).

Existen investigaciones donde se expone que la diferencia en la frecuencia de VPH detectada en las mucosas oral y genital sugiere que la afectación genital por VPH no se considera un factor necesariamente predisponente para la infección oral en el mismo paciente y por lo tanto la infección por VPH también se debe considerar como un evento independiente (38).

1.3.3 VACUNACIÓN PARA EL VPH

Las vacunas contra el VPH protegen contra la infección de este virus, entre ellas se pueden destacar Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix. Los tres tipos de vacunas disponibles protegen contra la infección de los VPH de alto riesgo (VPH-16 y VPH-18), aunque Gardasil también protege contra la infección por los tipos 6 y 11 del VPH. Gardasil y Cervarix muestran un 100% de protección contra las infecciones causadas por VPH-16 y 18. Gardasil 9 muestra una gran prevención para las infecciones causadas por VPH-6, 11, 16 y 18, también se comprobó una eficacia del 100% en la prevención de las enfermedades de cuello uterino, vagina y vulva causadas por VPH-31, 33, 45, 52 y 58 (39). Su gran eficacia se debe a que las vacunas muestran partículas muy parecidas a un virus formadas por elementos de la superficie del VPH, estas partículas son muy inmunogénicas por lo que estimulan al cuerpo humano para que genere grandes cantidades de anticuerpos (40).

1.4- MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

El VPH produce una serie de alteraciones a nivel de la célula infectada. Resultado de estas alteraciones son las lesiones oncogénicas relacionadas al VPH. Los biomarcadores representan un gran indicador biológico de la condición y del estado fisiológico celular en momentos determinados. El gran porcentaje de los marcadores biológicos indican la transformación relacionada a la infección por VPH y que son identificables durante una infección activa o bien después de esta (41). Entre los biomarcadores se pueden destacar aquellos que son marcadores específicos de la expresión de oncogenes de VPH, marcadores que indican una proliferación celular (p16, Ki67) o bien marcadores que indican inestabilidad cromosómica. Los marcadores

moleculares más importantes a la hora de relacionarse con el HPV asociado a lesiones orales son el p16 y Ki67 (42).

La proteína p16 está codificada por el gen supresor CDKN2A que se encuentra en el cromosoma 9p21. p16 actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas, haciendo disminuir así el ciclo celular. La sobreexpresión de la proteína p16 es detectable gracias a la tinción inmunohistoquímica, por lo que la p16 se considera uno de los mejores marcadores biológicos para identificar células con cambio displásico producido por el VPH (43). Existe una elevada especificidad en las lesiones displásicas relacionadas con la sobreexpresión de p16, destacan aquellas lesiones de alto grado ya que suelen ser siempre positivas (44).

Ki67 se trata de un antígeno que detecta las células que se encuentran en proliferación y se expresa en todas las fases del ciclo celular. Se establece una relación entre la presencia o ausencia de lesiones intraepiteliales y el grado de estas. Ki67 es un marcador biológico poco específico a la hora de detectar lesiones de carácter vírico ya que su expresión se ve aumentada en situaciones reactivas epiteliales (inflamación) y en linfocitos intraepiteliales, haciendo que se produzcan falsos positivos que dificulten la interpretación (45).

La detección simultánea de p16 (antiproliferación) y Ki67 (proliferación) podrían ser marcadores para la desregularización del ciclo celular debido a una infección por VPH. La tinción dual de p16/Ki67 se considera una de las pruebas más prometedoras para identificar lesiones premalignas, considerando como positivo la presencia de una o más células con ambos marcadores biológicos (46).

Por lo tanto, entre los diferentes marcadores biológicos destaca el p16 pues es el que representa la principal ayuda diagnóstica, complementaria a la morfología, que muestra una elevada especificidad y sensibilidad. Además de para el diagnóstico el p16 ha mostrado una gran utilidad en el pronóstico de las lesiones de las lesiones del cervix uterino. La expresión simultánea de p16/Ki67 demuestra la presencia de infección por VPH en una misma célula (47).

2. OBJETIVOS

Nuestro objetivo principal a la hora de la realización de este trabajo fue asociar la expresividad de los marcadores biológicos p16 y Ki67 con la presencia del VPH a nivel de la cavidad oral.

Como objetivo secundario hemos establecido el siguiente:

- Asociar la expresividad de p16 y Ki67 con características clínicas específicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS

De los archivos de la Unidad de Medicina Oral (Universidad de Santiago de Compostela, España) hemos recuperado a los pacientes con un diagnóstico de leucoplasia con estudio histopatológico. En 33 muestras de 31 pacientes, se dispuso de portaobjetos histológicos para su revisión y los bloques de parafina contenían material suficiente para el estudio de ADN. Las muestras fueron recopiladas en el complejo hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS) y fueron procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del mismo complejo, previa firma del consentimiento informado por parte de los pacientes. Fueron seleccionadas aquellas muestras de pacientes que mostraban lesiones orales clínicamente e histopatológicamente como leucoplasia y carcinoma epidermoide. Hemos incluido 16 citologías orales de pacientes sanos como controles.

Este estudio se encuadra en clase transversal descriptivo, donde lo que se ha hecho ha sido recolectar de manera retrospectiva aquellos pacientes donde la presencia o ausencia de VPH en las muestras analizadas muestra una relación con la expresividad de los marcadores biológicos p16 y Ki67.

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (Código de Registro: 2019/271; anexo 1). Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la comprensión adecuada y el consentimiento por escrito de los sujetos de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

3.2 ANÁLISIS DE VPH

La presencia de ADN del VPH se evaluó mediante el sistema CLART HPV 2 (Genomica, Madrid, España) que detecta los siguientes genotipos: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89. El sistema amplifica un fragmento de 450 pb de la región L1. Este se encuentra muy conservado en todos los VPH, pero muestra una amplia variación entre los diferentes tipos, lo que permite la caracterización de cada genotipo.

Se hicieron tres secciones, de 5 micrones de espesor cada una, de cada bloque. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvo ADN adecuado de buena calidad en solo 43 biopsias, pero en todas las citologías (16) analizadas para detectar la presencia de ADN del HPV. La evaluación histopatológica de la displasia fue realizada de forma

independiente por dos patólogos, según la clasificación de la OMS. Los grupos displasia grave y carcinoma in situ se agruparon para el análisis estadístico.

3.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE P16 Y Ki67

Se prepararon secciones de parafina de 3 micrómetros para hacer inmunohistoquímica de p16 y ki67.

La inmunohistoquímica se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki67 (FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clon MIB-1, Ready-to-Use, Agilent Dako, Santa Clara, EE.UU) con un equipo automatizado (Omnis, Agilent Dako, Santa Clara, EE.UU.) y la tinción inmunohistoquímica con p16 mediante la técnica de inmunoperoxidasa (anticuerpos anti-p16, CINtec Histology Kit, Clon E6H4).

En resumen, la recuperación del epítipo se realizó en un tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0 en el caso de ki-67 y de pH 9 en caso de p16) utilizando un baño de agua durante 40 minutos a 95-99 °C. La peroxidasa endógena se bloqueó con el reactivo bloqueador de peroxidasa (Agilent Dako, Santa Clara, EE.UU.) durante 5 minutos. La incubación con el anticuerpo primario (1/500) se realizó a temperatura ambiente durante 20 minutos y la tinción se reveló con EnVision (20 minutos) y DAB (10 minutos) (Agilent Dako, Santa Clara, EE.UU.). Por último, se contratiñeron con HE durante 15 minutos.

3.4 VARIABLES Y DATOS RECOGIDOS

Las variables y datos que han sido recogidos para el estudio fueron: número de historia clínica, número de biopsia, sexo, edad, tipo de lesión, localización, tipo de biopsia, tratamiento recibido, comorbilidades asociadas, presencia de displasia, presencia de carcinoma previo, la evolución clínica en el periodo del estudio, fumador, consumo de alcohol, el grado del alcohol consumido y por último el éxito.

- Positividad para HPV: Sí/No/Tipo
- Tipo de lesión: COCE, leucoplasia homogénea, leucoplasia nodular, leucoplasia verrucosa, nevus, liquen plano oral, papiloma, carcinoma epidermoide y eritroleucoplasia.
- Tipo de biopsia: incisional y escisional.
- Grado de displasia: sin displasia, displasia de bajo grado, displasia de alto grado, carcinoma in situ y carcinoma microinvasivo.

- Sexo: hombre o mujer.
- Tratamiento recibido: exéresis completa, vaporización y seguminiento.
- Localización de la lesión: encía, lengua, mucosa yugal, suelo de boca, reborde alveolar, encía marginal superior y paladar duro.
- Comorbilidades asociadas: hipertensión, cáncer gástrico, colon irritable, diabetes, antecedentes de linfoma de Hodking, lupus y no presenta comorbilidades.
- Presencia de carcinoma previo: Sí/No/Gástrico.
- Fumador: Sí/No/Ex
- Bebedor: Sí/No/Ex
- Grado de alcohol consumido: bajo/moderado/elevado
- Evolución clínica: estable, resolución, recidiva, nueva enfermedad y evento oncológico
- Exitus: No/Sí (por COCE) /Sí (por otras causas).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos clínicos fueron recopilados tras historias clínicas de los pacientes en una base de datos EXCEL creada para el estudio, posteriormente los datos se codificaron en datos numéricos para analizarlos estadísticamente. Para el análisis de estadística se usó el programa estadístico SPSS v.24.0 (IBM, Statistics, NY, USA) para Windows.

Las variables categóricas se describieron mediante frecuencias y porcentajes y las variables cuantitativas mediante media y desviación estándar. Para estudiar las relaciones existentes entre las variables categóricas, se utilizó la prueba chi cuadrado y, se establecieron tablas de contingencia. Para las diferencias de medias se usó el test T-Student o la ANOVA de una vía según condiciones de aplicación. Se construyeron gráficas de supervivencia basadas en curvas Kaplan-Meier. El nivel de significación, que se ha establecido para los resultados de la significación asintótica (bilateral), es un valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA MUESTRA

Un total de 33 muestras fueron incluidas en el estudio de las cuales 5 de ellas fueron descartadas por no tener acceso a las historias clínicas. Un total de 28 muestras fueron analizadas.

4.1.1. EDAD Y SEXO

Del total de pacientes 13 de ellos se corresponden con el sexo masculino (46,4%) y los 15 pacientes restantes al sexo femenino (53,6%). Respecto a la edad de los pacientes incluidos en el estudio el mínimo se corresponde con el 46,8 de edad y el máximo con el 92,2 siendo la media de edad de los pacientes de 65,83.

4.1.2 COMORBILIDADES

Los pacientes incluidos en el estudio mostraban una serie de comorbilidades, donde el 13 de los pacientes analizados padecían hipertensión (57,7%), 6 de los pacientes no padecían ningún tipo de enfermedad (23,1%), 1 de los pacientes dio señales de padecer colon irritable el (3,8%), 1 de ellos de ellos manifestó diabetes (el 3,8%), 1 de los pacientes resultó padecer lupus (3,8%), respecto a la presencia de cáncer gástrico dentro de los pacientes del estudio lo padecía 1 de los pacientes (3,8%) y si hablamos de la presencia de pacientes con antecedentes de linfoma Hodking resultó ser solamente 1 de los pacientes analizados en el estudio quién lo representaba (3,8%).

4.1.3 CONSUMO DE ALCOHOL Y TABACO.

En este estudio se estudiaron características de los pacientes como si eran fumadores o consumidores de alcohol. Respecto al hábito tabáquico se obtuvieron como resultados que 12 de los pacientes incluidos en el estudio el (60,0%) no eran fumadores, en cambio 3 de ellos si eran fumadores (15%) y 5 de los pacientes el eran ex fumadores (25%). Si analizamos la cantidad de cigarrillos fumados al día en el grupo de los fumadores obtenemos como resultados que 1 de los pacientes clasificado como fumador consumía entorno a unos 15 cigarrillos por día (20,0%) y 4 de los pacientes consumían sobre 20 cigarrillos al día (80%). Respecto a los años de consumo de fumadores se obtuvieron como resultados que 1 de los pacientes (50,0%) llevaba sobre unos 30 años como consumidor de tabaco y otro de los pacientes (50,0%) llevaba unos 48 años como fumador. Dentro del grupo de ex fumadores se pudo analizar los años que llevaban los pacientes como tal, se obtuvo que 2 de los pacientes incluidos en el grupo de ex fumadores el (50,0%) llevaban sobre 2 años habiendo dejado de fumar, 1 de los pacientes (25,5%) llevaba 15 años sin consumir tabaco y otro paciente (25,5%) llevaba entorno a 20 años sin hacer consumo del tabaco.

Si analizamos el consumo de alcohol de los pacientes incluidos en el estudio se obtuvo que 13 de los pacientes del estudio (65,0%) no son consumidores de alcohol, en cambio 7 de ellos (35,0%) sí son consumidores de bebidas alcohólicas. Si analizamos el tipo de alcohol consumido dentro del grupo de pacientes que toman bebidas alcohólicas los resultados obtenidos son que el total de pacientes (100%) y la cantidad de alcohol consumida por este grupo de pacientes es de un consumo moderado en 5 de los pacientes del grupo (71,4%) y de un consumo alto en 2 de ellos (28,6%).

4.1.4 TIPO DE BIOPSIA Y LOCALIZACIÓN

Para la realización del estudio y el análisis de las muestras se hicieron biopsias tanto incisionales en 16 de los pacientes del estudio (57,1%) como escisionales en 11 de los pacientes (39,3%) y en uno de los pacientes (3,6%) desconocemos el tipo de biopsia realizada. Respecto a la localización de las biopsias realizadas e incluidas en el estudio la mayor parte de ellas se localiza a nivel de la lengua ya que esta localización de la biopsia se corresponde con 14 muestras (51,9%), 5 de las biopsias realizadas (18,5%) se corresponden con la mucosa yugal, 2 de ellas el (7,4%) corresponden a la encía, 2 de las biopsias realizadas (7,4%) coinciden con el reborde alveolar, 2 de ellas (7,4%) al suelo de la boca, solamente 1 de las biopsias realizadas (3,7%) se corresponde a la encía marginal superior y 1 de las biopsias (3,7%) solo se corresponde con el paladar duro.

4.1.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LOS RESULTADOS

Los análisis de las muestras obtenidas revelaron que 17 de las muestras analizadas (57,1%) se asociaban a la presentación clínica de leucoplasia, 5 de las muestras (17,9%) coincidían con leucoplasia verrucosa y una de las muestras (3,6%) se asoció con una leucoplasia de tipo nodular. El resto de presentaciones clínicas obtenidas fueron de mácula en una de las muestras (3,6%), nevus en una de las muestras (3,6%), liquen plano oral en una de las muestras (3,6%), papiloma en una de las muestras (3,6%), úlcera en una de las muestras (3,6%) y por último eritroleucoplasia en una de las muestras analizadas (3,6 %). Por lo que la forma de presentación clínica más destacada en el estudio fue la leucoplasia de características homogéneas, seguida de una leucoplasia de tipo verrucoso.

4.1.6 TAMAÑO DE LA LESIÓN

En cuanto al tamaño de la lesión respecto a las muestras analizadas, el mínimo corresponde a 0,3 mm de tamaño y el máximo a 1,6 mm, siendo así la media del tamaño de la lesión de 0,900 mm.

4.1.7 GRADO DE DISPLASIA Y PRESENCIA DE CARCINOMA PREVIO

En el análisis de las biopsias realizadas se estudió el grado de displasia que podía presentar cada una de las muestras incluidas en el estudio, los resultados fueron los siguientes: en la mayoría de las muestras no se encontró ningún grado de displasia, esto se corresponde con el 15 de las muestras analizadas en el estudio (53,6%), en 6 de los casos analizados (21,4%) se indica un bajo grado de displasia y en 3 de los casos (10,7) se indica un alto grado de displasia. Se reveló la presencia de carcinoma in situ en 3 de los casos analizados (10,7%) y solamente uno de los casos incluidos (3,6%) resultó positivo para la presencia de COCE

En este estudio también se incluyó la presencia de carcinomas previos en cada uno de los pacientes, dando como resultado que 22 de los pacientes (81,5%) fueron de presencia negativa, en cambio 4 de ellos (14,8%) fueron de presencia positiva para carcinomas previos y en uno de los casos se detectó un carcinoma gástrico (3,7%),

4.1.8. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y TRATAMIENTO RECIBIDO

Al analizar la evolución clínica de los pacientes en el tiempo del estudio se obtuvieron resultados de una evolución estable en 5 de los casos analizados en el estudio (18,5%), de recidiva en 11 de los casos (40,7%) y de resolución en solo uno de los casos (3,7%). En el período de tiempo que duró el estudio también se obtuvieron resultados de presencia de algún evento oncológico en 10 de los casos (37%). El tratamiento que les fue dado a los pacientes de este estudio fue de un seguimiento en 14 de los casos del estudio (51,9%), a 12 de los pacientes se les practicó una exéresis completa (44,4%) y solo a uno de los pacientes se le realizó la vaporización (3,7%).

4.1.9. EXITUS

El exitus de los pacientes del estudio fue para 17 de ellos del (60,7%) como negativo y para los 11 pacientes restantes (39,3%) como positivo. En el caso de los pacientes que no lograron sobrevivir, 10 de ellos (35,7%) fallecieron por COCE y en uno el de los casos restantes (3,7%) la muerte fue por otra causa distinta de COCE.

4.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS EN DOBLE TINCIÓN, VPH, p16 Y Ki67

Respecto a la presencia de VPH en las muestras analizadas se encontró que 22 de los casos del estudio (78,6%) resultaron de presencia negativa para VPH y 6 de ellos (21,4%) fueron positivos para VPH. A la hora de analizar la presencia de los marcadores biológicos de interés en este estudio se obtuvo que para la presencia de Ki67 fue de un 100% en las muestras analizadas y para p16 los resultados fueron los siguientes: 10 de los casos incluidos en el estudio (55,6%) fueron negativos para la presencia de p16 y el 8 de los casos restantes (44,4%) fueron como positivos para la

presencia de este marcador biológico analizado en las muestras incluidas en el estudio. Al estudiar los resultados de la técnica de doble tinción usada en este estudio se encontraron que 10 de los casos (55,6%) resultaron como negativos y 8 de los casos restantes (44,4%) fueron positivos.

Los resultados descriptivos pueden verse en la Tabla 1.

VARIABLES	N (%)
Sexo	
Hombre	46,4 (46,4%)
Mujer	53,6 (53,6%)
Comorbilidades	
Hipertensión	57,7 (57,7%)
Diabetes	3,8 (3,8%)
Lupus	3,8 (3,8%)
No presenta	23,1 (23,1%)
Colon irritable	3,8 (3,8%)
Antecedentes de Linfoma de Hodking	3,8 (3,8%)
Tipo de Biopsia	
Escisional	39,3 (39,3%)
Incisional	57,1 (57,1%)
Localización de la Biopsia	
Encía	7,4 (7,4%)
Lengua	51,9 (51,9%)
Mucosa yugal	18,5 (18,5%)
Paladar duro	3,7 (3,7%)
Reborde alveolar	7,4 (7,4%)
Suelo de boca	7,4 (7,4%)
Displasia	
Bajo grado	21,4 (21,4%)
Alto grado	10,7 (10,7%)
COCE	10,7 (10,7%)
Sin displasia	53,6 (53,6%)
Carcinoma previo	
Presencia	14,8 (14,8%)
Ausencia	81,5 (81,5%)
Gástrico	3,7 (3,7%)

Evolución clínica en el periodo estudiado	
Estable	18,5 (18,5%)
Recidiva	40,7 (40,7%)
Resolución	3,7 (3,7%)
Evento oncológico	37,0 (37,0%)
Tratamiento	
Seguimiento	51,9 (51,9%)
Exéresis	44,4 (44,4%)
Vaporización	3,7 (3,7%)
Fumador	
Sí	15,0 (15,0%)
No	60,0 (60,0%)
Ex	25,0 (25,0%)
Consumidor de alcohol	
Sí	35,0 (35,0%)
No	65,0 (65,0%)
VPH	
Negativo	78,6 (78,6%)
Positivo	21,4 (21,4%)
Ki67	
Positivo	100 (100%)
P16	
Positivo	44,4 (44,4%)
Negativo	55,6 (55,6%)
Doble tinción	
Positivo	44,4 (44,4%)
Negativo	55,6 (55,6%)
Exitus	
Negativo	60,7 (60,7%)
Positivo	39,3 (39,3%)
Muerte por COCE	35,7 (35,7%)
Muerte por otras causas	3,6 (3,6%)

Tabla 1: datos descriptivos

En este estudio marcamos como objetivo principal el análisis de la positividad del HPV en cada uno de los casos seleccionados, así como de p16 y Ki67. Los resultados se muestran en la tabla número 2.

MUESTRA	VPH	P16	Ki67
1	Negativo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Positivo
3	Negativo	No evaluable	No evaluable
4	Negativo	No evaluable	No evaluable
5	Negativo	No evaluable	No evaluable
6	Negativo	No evaluable	No evaluable
7	Negativo	No evaluable	No evaluable
8 (NHC)	No evaluable	No evaluable	No evaluable
9 (NHC)	No evaluable	No evaluable	No evaluable
10	VPH 16	Negativo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Positivo
12	VPH 6	No evaluable	No evaluable
13	Negativo	Positivo	Positivo
14	Negativo	Negativo	Positivo
15	Negativo	Positivo	Positivo
16 (NHC)	VPH 51 Y 56	No evaluable	No evaluable
17	Negativo	Negativo	Positivo
18	Negativo	Negativo	Positivo
19	Negativo	No evaluable	No evaluable
20 (NHC)	Negativo	No evaluable	No evaluable
21	VPH 16	Positivo	Positivo
22	Negativo	Negativo	Positivo

23	Negativo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Positivo
25	VPH 51	Negativo	Positivo
26	VPH 56	No evaluable	No evaluable
27 (NHC)	Negativo	No evaluable	No evaluable
28	VPH 43	No evaluable	No evaluable
29	Negativo	No evaluable	No evaluable
30	Negativo	Positivo	Positivo
31	Negativo	Positivo	Positivo
32	Negativo	Positivo	Positivo
33	Negativo	Negativo	Positivo

Tabla 2: Resultados para VPH, p16 y Ki67. NHC: número de historia clínica.

4.3 RESULTADOS ANALÍTICOS

En este estudio se realizó el análisis de la asociación entre VPH y la técnica de doble tinción, los resultados no muestran una correlación entre estos dos datos por lo que la asociación no es significativa. ($p=0,671$).

Se realizó el análisis de la asociación entre el VPH y variables como el sexo, el grado de displasia, la evolución clínica en el periodo estudiado, el tabaco, el alcohol y el éxitus. En el caso del VPH y el sexo no se encontró una asociación significativa ($p=0,843$). Al relacionar el VPH con el grado de displasia de los casos del estudio se llegó a la conclusión de que no hay una relación significativa ($p=0,616$). A la hora de seguir relacionando el VPH con el resto de las variables, se usó la evolución clínica en el período estudiado para comprobar si había relación significativa, en este caso los resultados mostraron que no había ningún tipo de correlación entre VPH y la evolución clínica de los pacientes en el tiempo de período estudiado ($p=0,171$). Se relacionó el VPH con el consumo de tabaco, dando como resultado que no existía ningún tipo de correlación

entre VPH y tabaco ya que los resultados indicaron una asociación no significativa ($p=0,353$). En el caso de la relación entre VPH y el consumo de alcohol volvemos a encontrar que no existe ninguna correlación, ya que como pasa en los casos anteriores no se halló relación significativa entre el consumo de alcohol de los pacientes incluidos en el estudio y el VPH ($p=0,482$). Y por último se quiso estudiar la relación del VPH y de la mortalidad, esto dio como resultado una relación no significativa entre ambas variables estudiadas, es decir, no existe correlación entre la presencia de VPH y la mortalidad que mostraron cada uno de los pacientes incluidos en el estudio ($p=0,736$).

A continuación, en la tabla 3 se ven las asociaciones entre el VPH y las diferentes características clínicas del estudio.

VPH	Doble tinción	Asociación no significativa	P=0,671
VPH	Sexo	Asociación no significativa	P=0,843
VPH	Displasia	Asociación no significativa	P=0,616
VPH	Evolución	Asociación no significativa	P=0,171
VPH	Tabaco	Asociación no significativa	P=0,353
VPH	Alcohol	Asociación no significativa	P=0,482
VPH	Exitus	Asociación no significativa	P=0,736

Tabla 3: Relación entre VPH y las características clínicas

Tras el análisis del sexo, displasia, evolución clínica en el período del estudio, tabaco, alcohol y éxitus con el HPV y no encontrar ningún tipo de relación significativa se decidió relacionar la técnica de doble tinción para el análisis de los marcadores biológicos empleados en este estudio con las mismas variables de antes, es decir, con sexo, grado de displasia, evolución clínica en el período de estudio, alcohol, tabaco y éxitus. Los resultados fueron los siguientes:

En el caso del sexo no se encontró ninguna relación significativa con la doble tinción, ya que según los resultados obtenidos en el análisis de los datos no existe una correlación. ($p=0,387$). A la hora de ver la relación entre la doble tinción y el grado de displasia se encontró como resultado que tampoco había una asociación significativa ya que si nos remitimos a los resultados obtenidos no se muestra ningún tipo de correlación entre estos dos datos analizados ($p=0,418$). Por otro lado, también se quiso comprobar la relación que había entre la doble tinción y la evolución clínica en el periodo estudiado, como resultados se obtuvieron que no había una relación significativa entre ambas variables y que por lo tanto no existía correlación alguna, ya que así lo indican los resultados obtenidos en el análisis de los datos. ($p=0,658$). A la hora de analizar la relación entre la doble tinción y el hábito tabáquico de cada paciente incluido en el estudio se llegó a la conclusión de que no había una relación significativa entre la técnica de doble tinción y el consumo de tabaco de cada paciente ya que según los resultados obtenidos en el estudio no hay una asociación significativa, es decir, que no existe ningún tipo de correlación entre ambas variables relacionadas para el estudio ($p=0,332$). Una vez relacionado el tabaco con la doble tinción, se analizó el consumo de alcohol de cada paciente con dicha técnica, al igual que en el caso del tabaco no se encontró ningún tipo de relación o asociación significativa ya que los resultados obtenidos no muestran ningún grado de correlación posible ($p=0,679$). Y por último se quiso comprobar la relación que había entre la técnica de doble tinción y el éxito que cada uno de los pacientes mostró el estudio, en este caso los resultados obtenidos nos vuelven a indicar una asociación no significativa entre ambas variables analizadas, es decir, como pasaba en casos anteriores no se encontraron hallazgos de una correlación positiva ($p=0,168$).

En la siguiente tabla (tabla 4) se pone de manifiesto la asociación de la técnica de doble tinción y las características clínicas del estudio.

Doble tinción	Sexo	Asociación no significativa	P=0,387
Doble tinción	Displasia	Asociación no significativa	P=0,418
Doble tinción	Evolución	Asociación no significativa	P=0,658

Doble tinción	Alcohol	Asociación significativa	no	P=0,679
Doble tinción	Tabaco	Asociación significativa	no	p=0,332
Doble tinción	Éxitus	Asociación significativa	no	P=0,168

Tabla 4: Asociación entre la técnica de doble tinción y las características clínicas.

4.3.1 SEGUIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Para el análisis de la supervivencia se usó el estimador de Kaplan-Meier, se trata de un estimador no paramétrico de la función de supervivencia. Al realizar el análisis para VPH de los 28 casos incluidos en el estudio 22 de ellos dieron un resultado para VPH negativo y para los 6 casos restantes se obtuvo un resultado positivo para VPH. El número de eventos ocurridos (muertos) en el caso de VPH negativo fueron 9 casos y cuando hablamos de VPH positivo el número de eventos ocurridos fue de 2 casos. Los casos censurados para VPH negativo fueron de 13 casos y para VPH positivo fueron de 4 casos. A la hora de analizar el Log-Rank la significancia estadística es de 0,820 lo que es mayor que $p=0,05$ por lo tanto no hay una relación significativa estadísticamente. La supervivencia de los casos de VPH negativo es mayor que la supervivencia en los casos de VPH positivo. El promedio de tiempo sobrevivido en el caso de los pacientes que mostraron un VPH positivo fue de 158 meses con una desviación estándar de 25,07 y en cambio el promedio de tiempo sobrevivido en el caso de los pacientes que dieron como resultado un VPH negativo fue de 180 meses con una desviación estándar de 18,56; por consiguiente, tendríamos un global de 182 meses con una desviación estándar de 16,71. Como conclusión podemos decir que estos resultados nos indican que hay un mayor grado de supervivencia en aquellos casos donde el VPH es negativo respecto a aquellos casos donde el VPH se manifiesta como positivo, pero a pesar de esto no podemos hallar una relación significativa si hablamos de estadística.

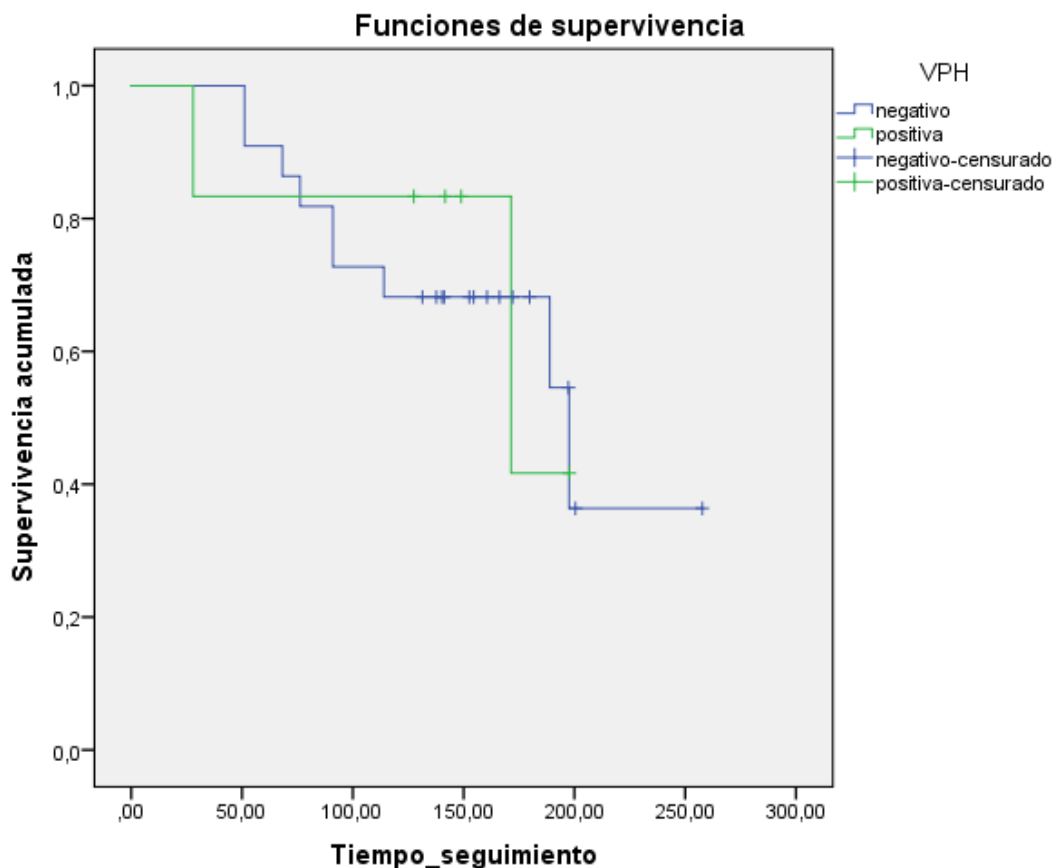


Figura 4: Supervivencia (meses) de biopsias con resultados positivos y negativos en VPH

También se realizó el análisis de la supervivencia respecto a la técnica de la doble tinción, en el análisis de Kaplan-Meier de los 18 casos analizados, 10 de ellos fueron negativos para la técnica de doble tinción y los 8 casos restantes fueron positivos para dicha técnica. El número de eventos en el caso de doble tinción negativa fue de 3 casos y para doble tinción positiva el número de eventos fue de 5 casos. A la hora de analizar los resultados obtenidos del Log-Rank, se llegó a la conclusión de que no hay una relación significativa estadísticamente ya que los resultados obtenidos en el análisis equivalen a 0,197 por lo que como pasaba anteriormente, este valor sigue siendo superior a $p=0,05$. El promedio de tiempo de supervivencia en el caso de una doble tinción negativa es de 196 meses con una desviación estándar de 26,26 respecto al promedio de supervivencia en el caso de una doble tinción positiva que equivale a 137 meses de supervivencia con una desviación estándar de 20,77; obteniéndose un global de 177 meses con una desviación estándar de 19,95. Por lo tanto, como resultado final o conclusión a la que llegamos a través de este análisis, aquí se refleja una mayor supervivencia en aquellos casos donde la doble tinción

tiene unos resultados negativos en vez de positivos, aunque a niveles de estadística no se pueda hacer una relación significativa.

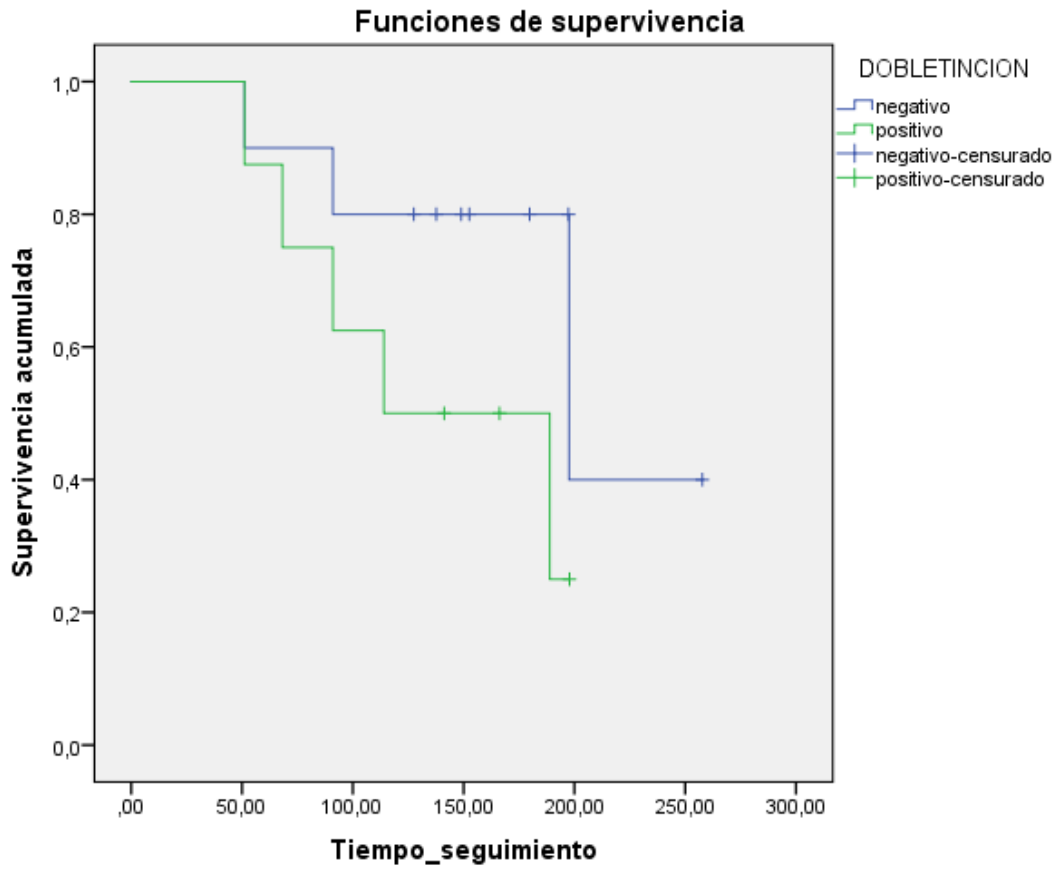


Figura 5: Supervivencia (meses) de biopsias con resultados positivos y negativos en doble tinción

5. DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado un total de 18 muestras para valorar la relación entre la expresión de p16 y ki67 con el VPH. En un principio se trataba de analizar a 33 muestras de las cuales 5 fueron descartadas por no tener acceso a las historias clínicas de los pacientes y de esas 28 muestras 10 fueron descartadas por no tener resultados en las biopsias para los marcadores biológicos p16 y Ki67.

Los autores Sritippho et al después de estudiar 41 muestras obtuvieron como resultado que las pruebas de sensibilidad y especificidad sugieren que p16 puede ser usado como marcador sustitutivo del VPH en COCE y en carcinoma verrucoso (48).

Existe una gran variación en la prevalencia del VPH en la leucoplasia y el COCE ya que existe una menor relación entre VPH y la leucoplasia y los genotipos específicos para VPH apenas tienen examen en la leucoplasia. En el caso del estudio realizado por Yang et al estudiaron el papel del VPH y la expresión de p16 para analizar la relación y patogénesis en la leucoplasia y en el COCE (49). La técnica de elección para el estudio de p16 en las biopsias obtenidas de las leucoplasias y de COCE fue la inmunohistoquímica. Los casos de leucoplasia y COCE positivos para VPH mostraban una sobreexpresión para p16. No se obtuvo una relación significativa entre VPH y leucoplasia o entre VPH y COCE. En el caso de variables analizadas como el sexo, la edad, el lugar, el tabaquismo o el consumo de alcohol tampoco se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas. Como conclusión se obtuvo que la detección de genotipos de VPH por PCR, combinada con la detección inmunohistoquímica para p16 puede ser más precisa para representar la infección por VPH.

P16 es un marcador biológico importante ya que su inactivación o silenciamiento epigenético se relaciona en cierta medida con el COCE, lesiones premalignas y el grado de displasia. Los autores Pérez-Sayáns et al en uno de sus estudios quisieron reportar de manera cuantitativa la expresividad de p16 y el estado de metilación en el COCE, evaluar la presencia de relación con los factores clínicos propios del estudio y los pronósticos correspondientes además de crear un modelo para predecir la supervivencia de los pacientes. En el estudio se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. La metilación de p16 no fue asociada con ninguna de las variables clínicas o patológicas. A nivel de la supervivencia se contrastó que había una mejoría en los pacientes que se encontraban en etapas iniciales en comparación a aquellos de etapas más avanzadas o desarrolladas. La supervivencia se redujo en aquellos pacientes que mostraban

cualquier grado de displasia en los márgenes adyacentes de las lesiones y aquellos pacientes con recaídas tenían un riesgo más elevado. Se concluyó que la expresión de p16 se reduce a medida que avanza el estadio del cáncer y que el silenciamiento epigenético de la proteína p16 está asociado con un riesgo de mortalidad más elevado. En diferentes estudios los resultados obtenidos se relacionan con la pérdida de la expresión de p16 y una reducción de la supervivencia (50).

En el caso de los autores Tomo et al se estudiaron 50 pacientes diagnosticados con leucoplasia oral, obteniendo datos clínico-patológicos, sociodemográficos, estilo de vida, tejido fresco y muestras de tejido en parafina. Realizaron un análisis inmunohistoquímico para p16, obteniendo como resultado que ninguna lesión resultó positiva para VPH, el 60% tenían inmunoexpresión de p16 baja y el 40% alta. En este caso se distingue entre inmunoexpresión para p16 entre alta y baja, en nuestro caso no hacemos esa distinción. Se llegó a la conclusión de que la inmunoexpresión de p16 no está asociado al VPH en la leucoplasia oral (51). Sin embargo, en otros estudios (52) no encontraron una relación significativa entre la expresión de p16 y los resultados clínicos, la supervivencia de los pacientes o el estadio (53). Dichos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio ya que los obtenidos en nuestro caso no reflejan una relación significativa con p16.

Si se relaciona p16 con la presencia de VPH en ciertos estudios los resultados obtenidos muestran que no hay una diferencia significativa entre los VPH positivos y los VPH negativos, así como tampoco hay una diferencia significativa entre los pacientes positivos para p16 y los negativos para p16. No se encontró relación entre la positividad de p16 y la tasa de supervivencia de los pacientes (54). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio ya que la asociación de p16 y VPH no ha sido favorable ($p=0,652$).

Los resultados varían bastante entre los diferentes estudios por lo que el uso o la aplicabilidad de p16 se muestra controvertida.

En tejidos de COCE asociados a VPH se ha informado sobreexpresión de p16. La detección inmunohistoquímica de p16 es una técnica sencilla, por lo que se utiliza la detección de p16 en ciertas lesiones orales premalignas como lo son la leucoplasia y en lesiones malignas como el COCE. Los autores Yang et al obtuvieron un resultado significativo de casos de COCE asociados a la sobreexpresión de p16 (55). A pesar de dichos resultados es recomendable el uso de estudios que se basen en la detección del ADN del VPH para que la detección inmunohistoquímica de p16 pueda ser un marcador fiable.

Hay diversos estudios donde p16 se muestra como un marcador prometedor para facilitar la ayuda para reconocer la presencia de displasia (56), pero por otro lado hay autores que dicen que p16 en realidad no debe usarse como un marcador para detectar la displasia o transformaciones malignas, ya que no es un marcador fiable (57).

Una de las limitaciones de nuestro estudio es la positividad de p16 ya que nosotros establecimos una distinción positiva y negativa (categórica) y otros estudios establecieron un estadiaje (alta, baja y no) y analizaron VPH 16 y 18 (58). Sería interesante valorar el estudio de diferentes tipos de VPH ya que nosotros analizamos el 16 y el 51. Esto dificulta la comparación entre los resultados de ambos estudios. Otra limitación ha sido el número de muestras analizadas ya que de las 18 muestras estudiadas solo 2 fueron VPH positivo, es necesario un tamaño muestral mayor.

El VPH influye en diferentes patologías y el uso de marcadores biológicos como el p16 podría ser de utilidad a nivel diario.

6. CONCLUSIÓN

Con la información que ha sido obtenida en este estudio, se han podido desarrollar las siguientes conclusiones:

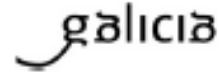
1. No se ha podido verificar una asociación estadísticamente significativa entre la expresividad de p16 y Ki67 y la presencia del VPH a nivel de la cavidad oral.
2. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la presencia del VPH y la doble tinción.
3. No hemos podido hallar una asociación clara entre la expresividad del marcador biológico p16 con las características clínicas estudiadas.
4. Tampoco se ha encontrado una asociación significativa entre p16 y Ki67 con el desarrollo del VPH.

7. ANEXOS

7.1. COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN DE GALICIA



Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Lorenzo Armenteros del Olmo, Secretario suplente del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 22 de octubre de 2019 el estudio:

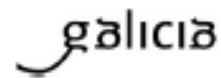
Título: Análisis clínico y molecular de la leucoplasia oral
Versión: 3.0
Promotor/a: Pilar Gándara Vila
Investigador/a: Pilar Gándara Vila
Código de Registro: 2019/271

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen FAVORABLE para la realización del citado estudio.





Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo



Este Comité emite el dictamen favorable condicionado a que se realicen las siguientes modificaciones en el protocolo y/o HIP:

- Incluir el lugar de reclutamiento de pacientes y grupo de comparación en la HIP que corresponda



8. REFERENCIAS

1. Khurshid, Z., Zafar, M. S., Khan, R. S., Najeeb, S., Slowey, P. D., & Rehman, I. U. (2018). Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. *Advances in Clinical Chemistry*, 86, 23-70. doi:10.1016/bs.acc.2018.05.002
2. De Paz, D., Kao, H., Huang, Y., & Chang, K. (2017). Prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. *Current Oncology Reports*, 19(10), 65. doi:10.1007/s11912-017-0624-3
3. American Cancer Society. (2020). Factores de riesgo para el cáncer de cuello uterino. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
4. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), 458-463. doi:10.4103/0973-1482.186696
5. Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Bahadar, H., Ismail Hassan, F., & Abdollahi, M. (2017). Smokeless tobacco (paan and gutkha) consumption, prevalence, and contribution to oral cancer. *Epidemiology and Health*, 39, e2017009. doi:10.4178/epih.e2017009
6. Johnson, N. (2001). Tobacco use and oral cancer: A global perspective. *Journal of Dental Education*, 65(4), 328-339.
7. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), 458-463. doi:10.4103/0973-1482.186696
8. Jafarey, N. A., Mahmood, Z., & Zaidi, S. H. (1977). Habits and dietary pattern of cases of carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J.P.M.A. the Journal of the Pakistan Medical Association*, 27(6), 340-343.
9. Keller, A. Z. (1969). Residence, age, race and related factors in the survival and associations with salivary tumors. *American Journal of Epidemiology*, 90(4), 269-277. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a121070
10. Piña-Sánchez, P., & Alvarado-Cabrero., I. (2012). Infección del virus del papiloma humano como un factor de riesgo para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *Gaceta Mexicana De Oncología*, 11(3), 175-181. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-infeccion-del-virus-del-papiloma-X166592011243939X>
11. Lizano, M., Berumen, J., Guido, M. C., Casas, L., & García-Carrancá, A. (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 89(16), 1227-1231. doi:10.1093/jnci/89.16.1227
12. García-García, A., & Bascones, M. A. (2009). Update in oral cancer .25(5)

13. Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M., & Mohammad, S. (2011). Oral cancer: Risk factors and molecular pathogenesis. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 10(2), 132-137. doi:10.1007/s12663-011-0195-z
14. Wahi, P. N., Kehar, U., & Lahiri, B. (1965). Factors influencing oral and oropharyngeal cancers in india. *British Journal of Cancer*, 19(4), 642-660. doi:10.1038/bjc.1965.80
15. Jané-Salas, E., Küstner, E., Lopez Lopez, J., & Llabrés, X. (2003). Importance of diet in the prevention of oral cancer. *Medicina Oral*, 8, 260-268.
16. Verma, S., & Mukherjee, S. (2021). Plummer vinson syndrome. *StatPearls* (). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538306/>
17. Planas, O. (2019). Radiación ionizante. origen y efectos sobre la salud.
18. Topol, E., & Teirstein Paul. (2015). *Interventional cardiology*. 7th edition.
19. Moore, S. R., Johnson, N. W., Pierce, A. M., & Wilson, D. F. (2000). The epidemiology of mouth cancer: A review of global incidence. *Oral Diseases*, 6(2), 65-74. doi:10.1111/j.1601-0825.2000.tb00104.
20. Betz, S. J. (2019). HPV-related papillary lesions of the oral mucosa: A review. *Head and Neck Pathology*, 13(1), 80-90. doi:10.1007/s12105-019-01003-7
21. Kate Middleton,¹ Woei Peh,¹ Shirley Southern,¹ Heather Griffin,^{1,2} Karl Sotlar,³ Tomomi Nakahara,⁴ Amira El-Sherif,⁵ Lesley Morris,⁶ Rashmi Seth,⁵ Marilyn Hibma,⁷ David Jenkins,⁵ Paul Lambert,⁴ Nicholas Coleman,⁶ and John Doorbar¹. (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of Virology*, 77(19)
22. Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53 Suppl 2, 166.
23. Conway, M. J., & Meyers, C. (2009). Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88(4), 307-317. doi:10.1177/0022034509333446
24. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, 55. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
25. Boguñá, N., Capdevila, L., & Jané-Salas, E. (2019). Relationship of human papillomavirus with diseases of the oral cavity. *Medicina Clinica*, 153(4), 157-164. doi:10.1016/j.medcli.2019.02.027
26. Martínez Martínez, A., Baldiris Ávila, R., & Díaz Caballero, A. (2012). Papiloma bucal producido por VPH y su relación con carcinoma. *Revista Clínica De Medicina De Familia*, 5(2), 144-145. doi:10.4321/S1699-695X2012000200012

27. Pennacchiotti, G., Sáez, R., Martínez, M. J., Cárcamo, M., & Montes, R. (2016). Prevalencia del virus papiloma humano en pacientes con diagnóstico de carcinoma escamoso de la cavidad oral. *Revista Chilena De Cirugía*, 68(2), 137-142. doi:10.4067/S0718-40262016000200005
28. Lorenzo-Pouso, A. I., Mariño-Méndez, H., Varela-Ponte, C., Pérez-Sayáns, M., Palmeiro-Fernández, G., González-Palanca, S., & Daley, E. M. (2020). Awareness levels of the link between oropharyngeal cancer and HPV infection among spanish women: A hospital-based cross-sectional study. *Journal of Cancer Education: The Official Journal of the American Association for Cancer Education*, doi:10.1007/s13187-020-01811-4
29. American Cancer Society. (2020). Factores de riesgo para el cáncer de cuello uterino. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
30. Smith, E. R., George, S. H., Kobetz, E., & Xu, X. (2018). New biological research and understanding of papanicolaou's test. *Diagnostic Cytopathology*, 46(6), 507-515. doi:10.1002/dc.23941
31. Vasconcelos Allende, M., Aranda, C., Ruiz Moreno, J. A., & Paz Fuentes, E. (1992). [The search for, detection and control of the human papillomavirus (HPV)]. *Ginecología Y Obstetricia De Mexico*, 60, 37-41.
32. Castro, Therezita M. Peixoto Patury Galvão, Filho, I. B., Nascimento, V. X., & Xavier, S. D. (2009). HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 75(2), 167-171. doi:10.1016/S1808-8694(15)30773-4
33. Ronald E. Millán I, Bernardoni Cecilia, Irama Oliva, Paz Mercedes, Rodriguez Esperanza, Salinas Yuri, . . . Ferrer María. (2004). Conocimiento actual sobre el virus del papiloma humano y su relación en la cavidad bucal y el periodonto. Retrieved from https://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/1/virus_papiloma_humano_vph.asp
34. Marchena Rodriguez, L., Sánchez Frías Marina, Osorio Robles, M., M^aFernandez Ortega, C., & Castaño Sélqui, A. (2014). Detección de un papiloma lingual en la consulta de odontología. Retrieved from http://www.gacetadental.com/wp-content/uploads/2014/05/259_CASOCLINICO_PapilomaLingual1.pdf
35. Smith, E. M., Ritchie, J. M., Summersgill, K. F., Hoffman, H. T., Wang, D. H., Haugen, T. H., & Turek, L. P. (2004). Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(6), 449-455. doi:10.1093/jnci/djh074
36. García- Roco Pérez, O., Arredondo López, M., & Álvarez Navarro, María del C. (2002). Citología exfoliativa en el diagnóstico precoz de lesiones oncológicas bucales. *Revista Cubana De Estomatología*, 39(2), 89-100.
37. Gandolfo, S., Carbone, M., Carrozzo, M., & Scamuzzi, S. (1993). [Biopsy technics in oral oncology: Excisional or incisional biopsy? A critical review of the literature and the authors' personal contribution]. *Minerva Stomatologica*, 42(3), 69-75.

38. De Guglielmo, Z., Avila, M., Veitía, D., Fernández, A., Venegas, C., & Correnti de Plata, M. (2012). HPV detection in the mouth and cervix of patients with histological diagnosis suggestive of genital infection. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 35(3), 445-454. doi:10.23938/ASSN.0100 Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296225>
39. Chatterjee, A. (2014). The next generation of HPV vaccines: Nonavalent vaccine V503 on the horizon. *Expert Review of Vaccines*, 13(11), 1279-1290. doi:10.1586/14760584.2014.963561
40. Instituto Nacional del cáncer, (NIH). (2019). Vacunas contra el virus del papiloma humano. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/hoja-informativa-vacuna-vph#r33>
41. Wentzensen, N., Bergeron, C., Cas, F., Vinokurova, S., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: Use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 111(1), 58-66. doi:10.1002/cncr.22420
42. Sritippho, T., Pongsiriwet, S., Lertprasertsuke, N., Buddhachat, K., Sastraruji, T., & Iamaroon, A. (2016). p16 - a possible surrogate marker for high-risk human papillomaviruses in oral cancer? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 17(8), 4049-4057.
43. Padhi, S. S., Roy, S., Kar, M., Saha, A., Roy, S., Adhya, A., . . . Banerjee, B. (2017). Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 73, 27-35. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.07.030
44. Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Padín-Iruegas, M. E., Gayoso-Diz, P., Reis-De Almeida, M., Barros-Angueira, F., . . . García-García, A. (2015a). The loss of p16 expression worsens the prognosis of OSCC. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 23(10), 724-732. doi:10.1097/PAI.0000000000000133
45. Gologan, O., Barnes, E. L., & Hunt, J. L. (2005). Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*, 29(6), 792-796. doi:10.1097/01.pas.0000163361.40357.b8
46. de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., . . . Bosch, F. X. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet. Oncology*, 11(11), 1048-1056. doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8
47. del Pino, M., Garcia, S., Fusté, V., Alonso, I., Fusté, P., Torné, A., & Ordi, J. (2009). Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(5), 488.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2009.05.046
48. Sritippho, T., Pongsiriwet, S., Lertprasertsuke, N., Buddhachat, K., Sastraruji, T., & Iamaroon, A. (2016). p16 - a possible surrogate marker for high-risk human

- papillomaviruses in oral cancer? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 17(8), 4049-4057.
49. Yang, L., Xiao, X., Li, C., Wu, W., Shen, X., Zhou, Z., . . . Shi, L. (2019). Human papillomavirus genotypes and p16 expression in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(3), 1022-1028.
50. Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Padín-Iruegas, M. E., Gayoso-Diz, P., Reis-De Almeida, M., Barros-Angueira, F., . . . García-García, A. (2015b). The loss of p16 expression worsens the prognosis of OSCC. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 23(10), 724-732. doi:10.1097/PAI.0000000000000133
51. Tomo, S., Biss, S. P., Crivelini, M. M., de Oliveira, Sandra Helena Penha, Biasoli, É R., Tjioe, K. C., . . . Miyahara, G. I. (2020). High p16INK4a immunoexpression is not HPV dependent in oral leukoplakia. *Archives of Oral Biology*, 115, 104738. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104738
52. Yakushiji, T., Noma, H., Shibahara, T., Arai, K., Yamamoto, N., Tanaka, C., . . . Tanzawa, H. (2001). Analysis of a role for p16/CDKN2 expression and methylation patterns in human oral squamous cell carcinoma. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 42(3), 159-168. doi:10.2209/tdcpublication.42.159
53. Muirhead, D. M., Hoffman, H. T., & Robinson, R. A. (2006). Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: Distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 59(7), 711-715. doi:10.1136/jcp.2005.030502
54. Blahak, J., Zelinka, J., Gumulec, J., Machacek, C., Danek, Z., & Bulik, O. (2020). HPV, protein p16 and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 164(3), 292-299. doi:10.5507/bp.2019.026
55. Yang, L., Xiao, X., Li, C., Wu, W., Shen, X., Zhou, Z., . . . Shi, L. (2019). Human papillomavirus genotypes and p16 expression in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(3), 1022-1028.
56. Gologan, O., Barnes, E. L., & Hunt, J. L. (2005). Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*, 29(6), 792-796. doi:10.1097/01.pas.0000163361.40357.b8
57. Buajeeb, W., Poomsawat, S., Punyasingh, J., & Sanguansin, S. (2009). Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 38(1), 104-108. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00710.x
58. Tomo, S., Biss, S. P., Crivelini, M. M., de Oliveira, Sandra Helena Penha, Biasoli, É R., Tjioe, K. C., . . . Miyahara, G. I. (2020). High p16INK4a immunoexpression is not HPV

dependent in oral leukoplakia. Archives of Oral Biology, 115, 104738.
doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104738