

**Cáncer escamocelular orofaríngeo: experiencias y avances en la Facultad de
Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia***

**Oropharyngeal Squamous Cancer: Experiences and Progress at Javeriana University's
Dental School, Colombia**

**Câncer Escamoso da orofaringe: experiências e avanços na Faculdade de Odontologia da
Pontificia Universidade Javeriana, Colômbia**

Fecha de recepción: 19-02-2020 | Fecha de aceptación: 18-06-2020

DABEIBA ADRIANA GARCÍA ROBAYO

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

garciaad@javeriana.edu.co; <https://orcid.org/0000-0003-0770-9138>

JAIRO ALBERTO BUSTILLO ROJAS

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

bustillo@javeriana.edu.co; <https://orcid.org/0000-0002-0868-8351>

FREDY OMAR GAMBOA JAIMES

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

gamboa@javeriana.edu.co; <https://orcid.org/0000-0003-2847-9837>

ÁNGEL CID ARREGUI

Instituto de Investigación en Cáncer, Heidelberg-Alemania.

cid@dkfz-heidelberg.de; <https://orcid.org/0000-0003-1433-2922>

CAMILO JAVIER BERNAL VÉLEZ

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

camilobernal@javeriana.edu.co; <https://orcid.org/0000-0001-7843-3285>

MALORY DANIELA GARCÍA QUIÑONES

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

mdgq1503@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7351-7519>

PAOLA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

paolahernandezsanchezs@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2023-2207>

*Artículo de reflexión sobre resultados de investigación

Correspondencia: garcia@javeriana.edu.co; bustillo@javeriana.edu.co;
gamboa@javeriana.edu.co; cid@dkfz-heidelberg.de; camilobernal@javeriana.edu.co;
ga.malory@javeriana.edu.co; hernandezsp@javeriana.edu.co

doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo39.ceoe>

Cómo citar: García Robayo DA, Bustillo Rojas J, Gamboa Jaimes FO, Cid Arregui A, Bernal Vélez CJ, García Quiñones MD, Hernández Sánchez P. Cáncer escamocelular orofaríngeo: experiencias y avances en la Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Univ Odontol. 2020; 39. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo39.ceoe>

RESUMEN

Antecedentes: En Colombia, el carcinoma escamocelular orofaríngeo (CEO) puede afectar tanto a hombres como a mujeres. Cerca del 30 % tiene como causa la infección con el virus del papiloma humano (VPH) y el 70 % se debe al consumo excesivo de tabaco y alcohol. La historia natural de la enfermedad del CEO es similar a la del cáncer cervical. Se ha observado una asociación positiva entre *Chlamydia trachomatis* y VPH. A partir de esa evidencia, se podría hipotetizar que, para el CEO, las bacterias orales tendrían alguna asociación positiva con el VPH. **Objetivo:** Exponer algunas experiencias y avances sobre el CEO en la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia. **Hallazgos:** En este grupo de investigación se realizó primero una descripción del papel del VPH en CEO (frecuencia, tipos virales de alto riesgo e integración viral) en muestras de pacientes con cáncer en Colombia. Un segundo estudio consistió en una revisión sistemática de la literatura en la que se buscó identificar posibles bacterias asociadas al desarrollo del CEO. En un último estudio se evaluó la frecuencia de bacterias orales asociadas a procesos carcinogénicos y su posible coinfección con VPH en pacientes con CEO e incluyó una comparación con personas sanas. **Conclusión:** En este manuscrito se presentan los resultados propios más relevantes que permiten comprobar la hipótesis formulada.

Palabras clave

bacteria; bacterioma; carcinoma orofaríngeo; epidemiología oral; medicina oral; microbiología; microbiología oral; microbiota; odontología; oncología; pronóstico; virus del papiloma humano

ABSTRACT

Background: In Colombia, oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSC) can affect both men and women. About 30% is caused by infection with the human papillomavirus (HPV) and 70% is due to excessive consumption of tobacco and alcohol. The natural history of OSC is similar to that of cervical cancer. A positive association has been observed between *Chlamydia trachomatis* and HPV. From that evidence, it could be hypothesized that, for OSC, oral bacteria could have some positive association with HPV. **Purpose:** To present some experiences and advances about OSC at Pontificia Universidad Javeriana from Bogotá, Colombia. **Findings:** In this research group, a description of the role of HPV in OSC (frequency, high-risk viral types, and viral integration) was first made in samples of cancer patients in Colombia. A second study consisted of a systematic literature review to identify possible bacteria associated with the development of OSC. In a third study, the frequency of oral bacteria associated with carcinogenic processes and their possible coinfection with HPV in patients with OSC was evaluated, and included a comparison with healthy people. **Conclusion:** This manuscript presents our most relevant findings that allow confirming the aforementioned hypothesis.

Keywords

bacteria; bacteriome; dentistry; human papilloma virus; microbiology; microbiota; oncology; oral epidemiology; oral medicine; oral microbiology; oropharyngeal carcinoma; prognosis

RESUMO

Antecedentes: Na Colômbia, o carcinoma de células escamosas da orofaringe (CEO) pode afetar homens e mulheres. Cerca de 30% são causados pela infecção pelo papilomavírus humano (PVH) e 70% pelo consumo excessivo de tabaco e álcool. A história natural da doença do CEO é semelhante à do câncer cervical. Uma associação positiva foi observada entre *Chlamydia trachomatis* e PVH. A partir dessa evidência, pode-se supor que, para o CEO, as bactérias orais teriam alguma associação positiva com o PVH. **Objetivo:** Apresentar algumas experiências e avanços sobre o CEO da Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colômbia. **Resultados:** Neste grupo de pesquisa, uma descrição do papel do PVH no CEO (frequência, tipos virais de alto risco e integração viral) foi feita pela primeira vez em amostras de pacientes com câncer na Colômbia. Um segundo estudo consistiu em uma revisão sistemática da literatura na qual se buscou identificar possíveis bactérias associadas ao desenvolvimento do CEO. Em um último estudo, a frequência de bactérias orais associadas a processos carcinogênicos e sua possível coinfeção com PVH em pacientes com CEO foi avaliada e incluiu uma comparação com pessoas saudáveis. **Conclusão:** Este manuscrito apresenta os próprios resultados mais relevantes que permitem verificar a hipótese.

Palavras-chave

bactéria; bacterioma; carcinoma orofaríngeo; epidemiologia oral; medicina oral; microbiologia; microbiologia oral; microbiota; odontologia; oncologia; prognóstico; vírus do papiloma humano

INTRODUCCIÓN

El cáncer orofaríngeo escamocelular (CEO) ocupa el sexto lugar en frecuencia por cáncer mundialmente (1). En Colombia, es poca la información epidemiológica existente y se estima que aproximadamente se presentan 129 nuevos casos anuales de tumores de labio, cavidad oral y faringe, de acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Cancerología en 2017 (2). Sin embargo, su incidencia se ha visto incrementada en población cada vez más joven, debido a que el consumo de alcohol y tabaco inicia en edades más tempranas. Ellos se consideran factores de riesgo del 70 % de pacientes con CEO, mientras que el 30 % restante se debe a infecciones virales como la del virus del papiloma humano (VPH), que se relaciona principalmente con prácticas sexuales como el sexo oral (3). Diversos estudios han mostrado que los tumores positivos para tipos oncogénicos de VPH presentan menor agresividad y formación de metástasis, lo que lleva a considerarlo de buen pronóstico. Esto se debe a que no se encuentran alteraciones genéticas permanentes como amplificaciones, deleciones o mutaciones, que sí están relacionadas con el consumo de alcohol y tabaco (4).

Sumado a lo anterior, el CEO se ha asociado a una pobre higiene oral, que genera un incremento cualitativo y cuantitativo de microorganismos. La microflora encontrada en cavidad oral facilita o promueve la carcinogénesis. Autores como Meurman y Uittamo (5) relacionan algunas bacterias de la cavidad bucal con la etiología del CEO. Estas afirmaciones se basan en la respuesta inflamatoria persistente generada por algunas bacterias orales y por la producción de acetaldehído, un metabolito común del consumo de alcohol y tabaco, que se considera carcinogénica al favorecer la formación de aductos en el ADN y, por ende, mutaciones principalmente de genes tumorales supresores (6).

En tiempos reciente, en la comunidad científica se aumentado el interés en determinar las posibles relaciones entre la microbiota bacteriana y viral y el desarrollo de cáncer orofaríngeo. Tateda *et al.* (6) observaron que *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*), uno de los microorganismos de importancia en cavidad oral, esté posiblemente relacionado con procesos de carcinogénesis, pues incrementa la concentración de acetaldehído en la boca (5).

Teniendo en cuenta que el CEO presenta similitudes en la historia natural de la enfermedad con el cáncer cervical, por su asociación con la infección del VPH (7,8), se ha sugerido en cáncer cervical una asociación positiva con coinfecciones entre bacterias (*Chlamydia trachomatis* [*C. trachomatis*]) y virus (VPH), puesto que la infección con *C. trachomatis* incrementa la infección y persistencia del VPH. Por tal razón, este grupo de investigación sugiere explorar si dicha coinfección tiene la misma asociación en la cavidad bucal. Sin embargo, en Colombia son pocos los estudios que han buscado profundizar en el conocimiento de la infección por VPH en casos de CEO. Por ello, el objetivo de este manuscrito es presentar al lector todas las experiencias y avances con respecto al CEO en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se puede caracterizar como descriptivo documental, ya que presenta y analiza diversas publicaciones sobre la infección por el VPH en CEO. Enfatiza los hallazgos de este equipo de investigación. El aumento del CEO asociado al VPH en Colombia y el mundo genera la necesidad de

conocer la frecuencia de la infección en este tipo de tumor, los factores virales asociados como la expresión e integración viral e, incluso, acercamientos de cómo el VPH se asocia a las bacterias orales en CEO. El fin a largo plazo es promover la implementación de medidas de prevención y pronóstico para esta enfermedad. Las experiencias que aquí se presentan tuvieron lugar entre 2014 y 2020.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CEO desde su diagnóstico

La cavidad oral se divide topográficamente en bermellón de los labios, piso de la boca, los dos tercios anteriores de la lengua, mucosa bucal, rebordes alveolares, paladar duro y triángulo retromolar. Entre 90 % y 95 % de las neoplasias malignas corresponden a carcinoma escamocelular, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (9).

En los labios, la patología maligna más común es el carcinoma escamocelular que es precedido por una leucoplasia o una queilitis solar o actínica. El carcinoma de labio inicia en la piel, el borde bermellón (principalmente), la comisura labial o la mucosa húmeda de los labios. Invade el músculo orbicular con una penetración linfática potencial a ganglios submentonianos y submandibulares, en la zona delimitada por el vientre anterior y posterior del músculo digástrico (9-10).

En el piso de la boca, los carcinomas escamocelulares son también los más frecuentes, seguidos de patologías malignas de origen glandular salival como carcinomas adenoide quísticos y carcinoma mucoepidermoide. El carcinoma escamocelular inicia a un lado de la línea media anterior del piso de la boca invadiendo la mucosa, los músculos genioglosos y genihioideos. El

músculo milohioideo actúa como una barrera hasta que la lesión se haya infiltrado (10). La invasión a la encía y el periostio mandibular es temprana. La extensión al periostio ocurre a lo largo y no transversalmente. La invasión de la mandíbula es un proceso tardío. Los carcinomas escamocelulares del piso de la boca, además, se pueden extender a la mucosa labial inferior y la piel. En la parte posterior se puede extender a los músculos de la lengua y a los conductos de las glándulas salivales submandibulares, los cuales obstruyen. En esta zona, la infiltración de los ganglios linfáticos ocurre aproximadamente en un 35 % de los casos (9-10).

En la lengua, más del 95 % de las neoplasias malignas corresponde a carcinomas escamocelulares que representan el 30-50 % de los tumores de cavidad oral. Anatómicamente, la lengua consiste en la punta, los bordes laterales, el dorso y la parte ventral. En la parte dorsal posterior limita con las papilas caliciformes que forman la uve (V) lingual. Los tumores malignos de las glándulas salivales que afectan a la lengua son de rara ocurrencia. El carcinoma escamocelular de la lengua se ubica principalmente en los bordes laterales, por la costumbre de muchas personas de colocar el cigarrillo en esos bordes, y le siguen las lesiones del tercio medio y la base de la lengua. El compromiso linfático se da en los ganglios yugulares medios o yugulo-carotídeos medios y los ganglios yugulares inferiores y yugulo-carotídeos inferiores o supraclaviculares mediales (11).

En la mucosa oral o del carrillo los carcinomas escamocelulares son poco frecuentes, pero sí lo son en el triángulo retromolar, esto es, la zona detrás del tercer molar inferior contiguo con el tercer molar superior a la altura de la tuberosidad del maxilar. La propagación linfática corresponde a los ganglios submentonianos, submandibulares, yugulares superiores o yugulo-digástricos, suboccipitales y mastoideos (9-11).

El desarrollo del CEO y oral se asocia a una serie de eventos celulares y moleculares, con repercusiones tisulares que terminan en una neoplasia. Existen factores muy claros asociados a la carcinogénesis de las neoplasias malignas, específicamente al CEO y oral (9-11).

El carcinoma escamocelular afecta la calidad de vida personal, familiar y social de quien lo padece. La lesión maligna en principio suele estar acompañada de lesiones que son fáciles de detectar tempranamente desde el punto de vista clínico. En cuanto a los estilos de vida, el uso de tabaco y alcohol y el VPH de alto riesgo adquirido en el contacto sexual están asociados a la génesis del CEO y oral, principalmente de las amígdalas (11). Las lesiones conocidas como trastornos orales potencialmente malignos pueden asociarse a los anteriores factores en el curso o historia de la enfermedad de las lesiones malignas de la cavidad oral y la orofaringe (12). Para el caso colombiano, se ha establecido que la mayoría de las patologías malignas de la cavidad oral y orofaringe están precedidas por trastornos orales potencialmente malignos, que pueden detectarse mediante un examen clínico oral riguroso. Se diagnostican mediante biopsia y análisis histopatológico (9-12). Sin embargo, existen desafíos para detectar oportunamente trastornos potencialmente malignos en la consulta que usualmente están asociados a las competencias clínicas, así como a restricciones de tiempo durante la consulta. Clínicamente, un carcinoma escamocelular de la cavidad oral puede estar precedido por ulcera, leucoplasia, eritroplasia, leucoeritroplasia y lesiones proliferantes y verrucosas (9-12). De la misma forma, numerosos trastornos se han asociado a un mayor riesgo para desarrollar un carcinoma escamocelular. Se incluyen leucoplasia, eritroplasia, liquen plano oral, fibrosis submucosa oral, queilitis actínica, estomatitis

nicotínica o paladar del fumador, lupus eritematoso discoide, algunos trastornos hereditarios, como disqueratosis congénita y anemia de Fanconi (9-12).

El diagnóstico histopatológico en la mayoría de los tumores malignos de la cavidad oral, la lengua y la orofaringe clasifica los carcinomas escamocelulares como bien diferenciados, moderadamente diferenciados y mal o pobremente diferenciados. El carcinoma escamocelular bien diferenciado se caracteriza por la presencia de células neoplásicas escamosas de citoplasma eosinófilo. El núcleo puede ser hiper cromático o no serlo, nucléolo es prominente, hay mitosis atípicas distribuidas en cordones o islas grandes de epitelio que infiltra el estroma o corion, con áreas de disqueratosis o queratinización individual y formación de perlas de queratina. Los carcinomas escamocelulares menos diferenciados tienden a tener proyecciones irregulares o similares a dedos o islas pequeñas y células individuales dispersas en el frente invasivo (9-12).

El pleomorfismo celular, el polimorfismo nuclear, la hiper cromasia nuclear y las figuras mitóticas típicas y atípicas aumentan con el grado de diferenciación escamosa. Adicionalmente, el pronóstico no se relaciona *per se* con el grado de diferenciación y queratinización. Se debe tener en cuenta la profundidad de invasión tumoral (DOI, por la sigla en inglés: *depth of invasion*) (12) que se mide milímetros, y la invasión vascular y perineural. En carcinoma escamocelular pobremente diferenciado la diferenciación escamosa es mínima o está ausente, por lo que se precisa de una confirmación de la naturaleza epitelial por medio de anticuerpos de tipo AE1/AE3, CK5/6, p63 y p40 (12).

La hiperplasia epitelial es un aumento en el número normal de células escamosas y basales. El solo aumento del número de células escamosas se conoce como acantosis. No hay atipias celulares o pérdida de la arquitectura con un proceso de maduración y estratificación regular (9-12). Por otra parte, en la displasia epitelial se aprecia atipia celular, pérdida de la maduración y de la estratificación normal del epitelio (13). En la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para el diagnóstico de displasia epitelial se tienen en cuenta los criterios que se describen en la tabla 1.

TABLA 1
CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DISPLASIA EPITELIAL

Cambios en la arquitectura	Cambios celulares
Estratificación irregular	Anisonucleosis o variación en el tamaño nuclear
Pérdida de la polaridad de las células basales e hiperplasia de células basales	Pleomorfismo nuclear
Crestas epiteliales en forma de gota	Anisocitosis o variación en el tamaño celular
Incremento en el número de mitosis	Incremento en la relación núcleo-citoplasma
Disqueratosis	Mitosis atípicas
Perlas de queratina	Nucléolo prominente y aumento en el número
	Hipercromatismo aumentado

Al realizar el análisis histopatológico de la biopsia de una lesión de tipo leucoplasia lingual (figura 1), los hallazgos pueden corresponder a hiperplasia epitelial con ortoqueratosis o paraqueratosis, que puede tener diferentes grados de maduración epitelial. Estos son displasia leve, moderada, grave o carcinoma escamocelular queratinizante con infiltración superficial. En las figuras 2-6 se aprecian los diferentes grados y la evolución de la displasia hasta carcinoma escamocelular queratinizante infiltrante (fotografías tomadas por el Jairo Bustillo).

FIGURA 1
LEUCOPLASIA LINGUAL



FIGURA 2
ACANTOSIS O HIPERPLASIA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, EPITELIO GRUESO

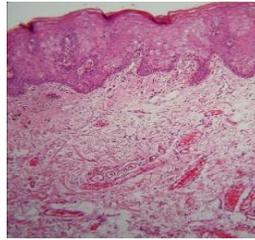


FIGURA 3
HIPERPLASIA DE CÉLULAS BASALES. LAS CÉLULAS INTENSAMENTE TEÑIDAS CORRESPONDEN A LAS CÉLULAS BASALES

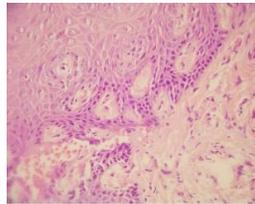


FIGURA 4
CAMBIOS ARQUITECTÓNICOS EN EL TERCIO INFERIOR DEL EPITELIO. ATIPIA CELULAR LEVE

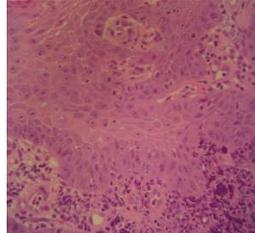


FIGURA 5
CAMBIOS ARQUITECTÓNICOS SE EXTIENDEN HASTA EL TERCIO MEDIO Y SUPERIOR. LA ATIPIA CELULAR ES MODERADA Y HAY PRESENCIA DE MITOSIS

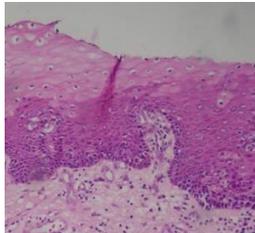


FIGURA 6
CAMBIOS ARQUITECTÓNICOS SE EXTIENDEN AL TERCIO SUPERIOR DEL EPITELIO. LA ATIPIA CELULAR ES SEVERA

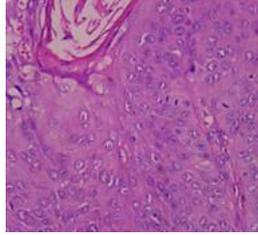
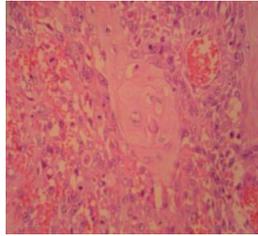


FIGURA 7
CARCINOMA ESCAMOCELULAR INFILTRANTE



Virus del papiloma humano

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Es un virus ADN de doble cadena circular, sin envoltura, que infecta la mucosa y el epitelio cutáneo de una amplia variedad de vertebrados superiores (3). El genoma del VPH está formado por regiones codificadoras (ORF), que se designan como tempranas (E1-E7) y tardías (L1 Y L2), y una región no codificadora (NCR o URR) que contiene el promotor y controla la transcripción de los ORF (14,15). El gen E1 está involucrado en la replicación viral y el mantenimiento del genoma. El gen E2 es un regulador transcripcional implicado en la replicación viral y la regulación negativa de los genes E6 y E7. El gen E4 induce coilocitosis y facilita la salida de las partículas virales. El gen E5 está relacionado con la transformación celular porque interactúa con receptores de factores de crecimiento encontrados en la membrana celular (15,16). Los genes E6 y E7 codifican las proteínas con la mayor capacidad oncogénica del virus, ya que son capaces de inducir proliferación, immortalización y transformación celular. La oncoproteína E6 promueve la degradación de p53, un importante regulador del ciclo celular, que promueve la entrada de la célula en fases S, además

de bloquear algunos inhibidores de ciclinas, como p21 y p27, y coactivadores de p53, como p300/CBP, IRF3 y Tyk2. La oncoproteína E7 se une a la proteína pRB fosforilada. Esta unión rompe el complejo pRB/E2F y libera el factor de transcripción E2F-1 que induce la transcripción de genes requeridos para la entrada a la fase S del ciclo celular. Por otro lado, la oncoproteína E7 aumenta las ciclinas A y E y se puede unir a la histona deacetilasa (regulador de E2F) y a IRF1 y p48, entre otros (17-19). Finalmente, los genes L1 y L2 (región tardía) se transcriben en los estadios finales del ciclo viral y hacen parte de la cápside del virus.

El ciclo de vida del VPH comienza cuando las partículas virales consiguen, a través de pequeñas roturas o microabrasiones, infectar la capa basal del epitelio (16). El ciclo de replicación al interior del epitelio puede dividirse en dos partes. En primer lugar, el genoma viral se replica hasta aproximadamente 100 copias por célula y, durante periodos variables, mantiene este bajo número de copias que todavía son competentes y capaces de replicarse. Las proteínas virales E1 y E2 son esenciales en esta fase de replicación basal del ADN. En segundo lugar, una vez las células basales llegan al compartimento suprabasal, se altera su capacidad de dividirse y se incrementa el número de copias virales. Asimismo se pone en marcha el programa de diferenciación terminal que, en capas superficiales del epitelio, inicia la síntesis de proteínas estructurales para el ensamblaje de las partículas virales. Es decir, la replicación está asociada al proceso de diferenciación celular. Los papilomavirus se replican en este compartimento, pasan al epitelio vecino y aprovechan el recambio natural de las células epiteliales infectadas con el virus (16).

Se han descrito más de 100 tipos de VPH, de los cuales cerca de 14 están involucrados en la formación de neoplasias epiteliales. Se les denomina virus de alto riesgo, por tal razón, determinar

los tipos virales permite predecir el pronóstico de un paciente. A los tipos virales asociados a procesos de carcinogénesis se les conoce como de alto riesgo. Los tipos más comunes relacionados con las afectaciones en mucosa de las vías aéreas incluyen VPH-16, VPH-18 y VPH-31 (20-22). El VPH 16 es el tipo viral más común detectado en cáncer oral-orofaríngeo en un 90 %-95 % de los tumores positivos para VPH (22-24). Por otro lado, diferentes trabajos muestran que factores asociados al virus, como la persistencia de infección, la carga viral, la expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7 y la integración del ADN viral dentro del genoma de la célula hospedera y la inactivación del gen viral E2 junto a la acumulación de mutaciones oncogénicas, que conllevan a la progresión de lesiones preneoplásicas a cáncer (25).

El virus puede mantenerse en la célula del huésped de forma extracromosomal (episomal) o integrado en el ADN del huésped (21-24,26,27). Los VPH de bajo riesgo se mantienen predominantemente de forma extracromosomal circular como episomas. Sin embargo, los VPH de alto riesgo pueden encontrarse también en una forma integrada. Así, el ADN viral de genotipos de alto riesgo puede encontrarse de tres formas: integrado, episomal o mixto, lo que incrementa su persistencia (28). El proceso de integración viral resulta en la pérdida de la función de los genes E1 y E2, con múltiples patrones de ruptura en estos genes, lo que hace necesaria la evaluación de la secuencia completa de E1 y E2 por PCR principalmente (28). La pérdida de funcionalidad de estos genes favorece una mayor capacidad de immortalización y aumento de la expresión de los genes E6 y E7 debido a que el gen E2, con su secuencia completa, es reconocido por una región reguladora adyacente al promotor (p97 para VPH16) y reprime de esta forma la expresión génica viral. Su disrupción al momento de la integración viral de-reprime el promotor viral aumentando la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (20).

Durante los últimos años se ha comprobado que el VPH es el agente etiológico del cáncer cervical y también ha sido relacionado como agente causal de un subconjunto de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. Algunos estudios han estimado que hasta un 60 % este tipo de carcinoma puede ser positivo para VPH. Tal subconjunto afecta principalmente las amígdalas (24,29).

La relación del VPH con el CEO se ha estudiado poco en Colombia. Son pocos estudios en cáncer de cabeza y cuello asociado a VPH. Uno de ellos lo realizaron Quintero *et al.* (30), quienes encontraron una prevalencia de VPH del 18,9 %. En otro estudio realizado por Ordoñez *et al.* (31) se incluyeron 1.866 casos de cáncer oral y orofaringe descritos entre 1962 y 2012 y mostraron una frecuencia de VPH del 28,6 %. El presente grupo de investigación realizó en 2015 un estudio multicéntrico descriptivo de corte transversal, en las ciudades colombianas de Bogotá, Manizales y Bucaramanga. Se incluyó un total de 46 pacientes diagnosticados clínicamente por el cirujano de cabeza y cuello con carcinoma de orofaringe y en los que estaba indicada cirugía. Al momento de la intervención quirúrgica, se tomaron biopsias de tejido tumoral para realizar extracción de ADN y ARN (32).

A partir del ADN se realizó tipificación del virus mediante el estuche Multimetrix Multiplex HPV Genotyping RVO®, que detecta 24 tipos virales, incluidos todos los catalogados como de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82). Se detectó la presencia de VPH de alto riesgo en 10 de los 46 pacientes, lo que representa una frecuencia del 22 %. Al realizar comparaciones entre las diferentes ciudades, se observó que en Manizales 8 de 21 casos (38 %) presentaron infección por VPH, mientras que en Bogotá se halló 1 entre 20 (5 %). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,03$). En relación con el tipo más frecuente, se encontró

que el VPH-16 fue el más frecuente, con 9 de las 10 muestras positivas para el virus (90 %). El otro tipo viral de alto riesgo encontrado fue el VPH-58 que correspondió al 10 % restante. Con base en los resultados de la tipificación de VPH se realizó un análisis de integración viral con PCR Multiplex con zonas superpuestas que cubren la secuencia completa de los genes E1 y E2 de VPH-16. Se halló que 8 de 9 muestras (89 %) presentaban un estado físico mixto (episomal/integrado) y la otra muestra (11 %) mostró un estado físico episomal para VPH-16. La disrupción del genoma viral para integrarse al genoma de la célula huésped sucedió en diferentes regiones de los genes E1 y E2, con mayor prevalencia de la disrupción en el sitio de unión de E1 y E2 (nt 2525 a 3720). A partir del ARN se identificaron los niveles de expresión del genotipo VPH-16 mediante cuantificación absoluta de PCR en tiempo real. La determinación de los niveles de expresión fue posible en 6 de las 9 muestras (66,7 %), donde el número de copias transcritas en 500 ng de cDNA osciló entre 1 y 11 copias. Copias <1 se consideraron como no transcripcionalmente activas (32).

Bacterioma oral y cáncer escamocelular de orofaringe

La cavidad oral es la principal puerta de entrada de microorganismos al cuerpo (33). Un desequilibrio ecológico de la comunidad microbiana en cavidad oral puede traducirse en enfermedad, no sólo en la cavidad bucal sino en otras partes del cuerpo (34). Se estima que la biodiversidad oral representa más de 700 especies microbianas de las cuales solo 20 % son cultivables y la mayoría son bacterias comensales (35). Hasta hace algunos años existía una gran dificultad para determinar las bacterias asociadas a patologías, debido a la alta complejidad de los ecosistemas y las limitaciones de las herramientas metodológicas disponibles, para describir los microorganismos asociados a estados de salud o enfermedad. Recientemente, varios estudios han empleado la secuenciación de alto rendimiento para analizar la fuente y la riqueza de especies de

la microbiota oral. Las estimaciones de diversidad con este tipo de tecnologías sugieren que en la cavidad oral humana pueden existir hasta 19.000 filotipos (34-36). La posible asociación bacteriana en la carcinogénesis oral, en general, puede deberse a: 1) infecciones crónicas, interferencias en el ciclo celular y vías de señalización de las células epiteliales; 2) al metabolismo bacteriano que incrementa la concentración de sustancias carcinogénicas; 3) al incremento de mutaciones en genes tumorales supresores y proto-oncogenes, por el incremento de radicales libres; o 4) al producto de una respuesta inflamatoria crónica (35,36).

Sin embargo, no todas las personas que beben alcohol o fuman desarrollan cáncer. Se han sugerido algunas explicaciones, como Meuman y Uittamo (6) y Ahn *et al.* (37), quienes plantean que los microbiomas (comunidades ecológicas de todos los microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten un espacio) pueden presentar diferencias importantes entre personas, en cuanto a la velocidad en que se metabolizan los compuestos de etanol y tabaco, o al desequilibrio ecológico favorable a ciertas bacterias que metabolizan el etanol.

Gracias a la tecnología de secuenciación de alto rendimiento se ha logrado describir las bacterias presentes en pacientes con CEO y compararlas con personas sanas. Hay algunos estudios relevantes en este tema. En 1998, Nagy *et al.* (38) compararon bacterias cultivadas de muestras de CEO y muestras de tejidos sanos de los mismos pacientes. Encontraron una mayor presencia de los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Fusobacterium* en tejidos tumorales. Otro estudio confirmó la presencia de *Fusobacterium* en este tipo de cáncer (39). En cuanto a especies bacterianas, *Fusobacterium nucleatum* se ha asociado frecuentemente con muestras tumorales de pacientes con CEO (40,41). Tasas elevadas del género *Streptococcus* en muestras de cáncer también se han hallado

en CEO (42). Particularmente, una mayor abundancia de *Streptococcus gordonii* se ha relacionado con CEO (43,44), así como *Streptococcus parasanguinis* (44). La asociación del género *Prevotella* en pacientes con cáncer o grupos de control sanos debe definirse más al nivel de especie. Así, *Prevotella melaninogenica* (*P. melaninogenica*) se ha asociado por unanimidad con muestras de cáncer de CEO (43,45). Una especie de Actinobacteria variada y controvertida es *Rothia mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*). Un estudio de Pushalkar *et al.* (42) describió el aumento de esta especie en la saliva de pacientes con CEO. Sin embargo, otros estudios informaron de una abundancia notablemente mayor de *R. mucilaginosa* en controles de pacientes sanos (39,40,43).

Estudios complementarios en los que se efectuaron cultivos microbiológicos o PCR identificaron bacterias asociadas al CEO. Encontraron bacterias de interés como *P. melaninogenica* del phylum Bacteroidetes, *Fusobacterium naviforme* (*F. naviforme*) perteneciente al phylum Fusobacterias y *S. anginosus* del phylum Firmicutes (45-49). En estudio realizados por Tao *et al.* (50) y Schwartz *et al.* (51) se evaluó *in vitro* la relación entre la infección entre *Streptococcus* spp y la de VPH en queratinocitos expuestos a etanol. Hallaron una relación cooperativa entre los dos microorganismos con un incremento en la concentración de acetaldehído producto del metabolismo del etanol al compararlo con las concentraciones producidas por la infección de *Streptococcus* spp sin VPH.

VPH y bacterias asociadas a cáncer

En los últimos años, varios autores han sugerido que la infección por *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical. *C. trachomatis* es uno de los patógenos de transmisión sexual más comunes mundialmente y está relacionada principalmente con vaginosis bacteriana. Sin embargo, existe gran controversia de sí la infección con *C.*

trachomatis también se encuentra relacionada con el cáncer cervical. Por tal razón, Zhu *et al.* (52) realizaron un meta-análisis para esclarecer la evidencia. Encontraron en 22 estudios mayor frecuencia de la infección en 41,95 % por *C. trachomatis* en pacientes con cáncer cervical (4.291 casos) al compararlos con personas sin cáncer cervical o controles (7.628 controles) 26,27 %. Además calcularon un OR de 2,21 entre la presencia de la bacteria y el riesgo a desarrollar cáncer cervical; aunque el OR aumentaba a 4,03 con la presencia simultánea *C. trachomatis* y VPH (52). Confirmando estos resultados, autores como Silins *et al.* (7) e Insinga *et al.* (8) sugirieron que la infección con *C. trachomatis* incrementa la infección y persistencia del VPH.

Con base en estos hallazgos, en un reciente trabajo realizado por el presente grupo de investigación, se recolectaron 26 muestras tumorales de pacientes con cáncer de orofarínge y 26 muestras de cepillados de mucosa oral de personas sin cáncer (grupo control). A todas las muestras se realizaron pruebas de detección de VPH y VPH-16 y *S. anginosus*, *P. melaninogenica* y *F. naviforme*. La frecuencia de VPH fue del 76,9 % en pacientes con cáncer, mientras que en el grupo de personas sin lesiones aparentes, al examen clínico, la frecuencia de VPH fue del 38,4 %. En cuanto al tipo viral VPH-16, en los participantes del estudio se encontraron frecuencias de 61,5 % y para el grupo de personas sin cáncer fue de 30,8 %. En relación con la frecuencia de bacterias orales relacionadas con cáncer oral, no se detectaron *P. melaninogenica* o *F. naviforme* en ninguna de las muestras analizadas. Con respecto a la frecuencia de *S. anginosus*, en el estudio del presente grupo se detectó esta bacteria en el 38,5 % de los pacientes con cáncer, en tanto que la frecuencia en personas sin cáncer de orofarínge fue de 30,8 %. Finalmente, la coinfección por *S. anginosus* y VPH o VPH-16 fue mayor en pacientes con CEO (8 de 10) comparada con personas sin cáncer (2 de 8 VPH y 6 de 10 VPH-16) y de 1 en 8 para el grupo control (53). Ello sugiere que en CEO, al

igual que para el modelo de cáncer cervical, es importante detectar coinfección (bacterias y virus) en personas en riesgo a desarrollar cáncer. Finalmente, es importante hacer hincapié en la importancia de detectar microorganismos asociados al cáncer oral-orofaríngeo como el VPH y *S. anginosus*, lo cual puede ser provechoso en estrategias de promoción y prevención en salud, incrementando la detección de trastornos potencialmente malignos, las cuales facilitan al clínico determinar con mayor precisión el pronóstico del paciente.

Perspectivas

Se ha logrado evidenciar la fuerte asociación que tienen las bacterias orales con el CEO. Sin embargo, existe aún controversia sobre cuáles bacterias específicamente se asocian a dicha patología, debido a la diversidad de metodologías y a la diversidad de poblaciones que se han estudiado. Por tal razón, es importante realizar estudios metagenómicos en los que se describa el microbioma oral (bacterioma y viroma) de pacientes con y sin CEO en población colombiana. Por otra parte, sería muy interesante evaluar posibles coinfecciones entre los dos microorganismos (bacterias-virus), con el fin de proponer a futuro posibles biomarcadores microbiológicos no invasivos, puesto que las muestras de saliva son una fuente invaluable en cavidad oral para la detección.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al grupo de investigación Centro de Investigaciones Odontológicas a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, por la financiación de los siguientes proyectos de investigación: “Identificación de biomarcadores involucrados en la progresión o regresión de cáncer asociado al VPH, a través de muestras de tejido para estudio

histopatológico, en la ciudad de Bogotá” (ID propuesta 7736) y “Análisis integrativo del microbioma y transcriptoma presente en placa dental, saliva y tejido tumoral en carcinoma oral y su relación con el metaboloma microbiano determinado en saliva” (ID propuesta 7745).

REFERENCIAS

1. Monsjou HS, Balm AJ, van den Brekel MM, Wreesmann VB. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: A unique disease on the rise? *Oral Oncol.* 2010; 46(11): 780-785. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.08.011>
2. Instituto Nacional de Cancerología-ESE (INC). Anuario estadístico 2017. Volumen 15. Bogotá, Colombia; INC; 2020. <https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/AnuarioINC2017>.
3. Betiol J, Villa L, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(3): 217-226. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20132703>
4. González Díaz M, Motta-Vargas L, Moreno Torres A, Chala Galindo A, Tupaz Erira H, García-Robayo D. La infección por virus del papiloma humano afecta el pronóstico del cáncer orofaríngeo escamocelular. *Univ Odontol.* 2014; 33(71): 55-63. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.ivph>.
5. Meurman J, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Act Odontol Scand.* 2008; 66(6): 321-326. <https://doi.org/10.1080/00016350802446527>
6. Tateda M, Shiga K, S. S, Sone M, Hori T, Yokoyama J, et al. Streptococcus anginosus in head and neck squamous cell carcinoma. Implication in carcinogenesis. *Int J Mol Med.* 2000; 6(6): 699-703. <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.6.699>.

7. Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson B, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 110-115. <https://doi.org/10.1002/ijc.20970>
8. Insinga R, Pérez G, Wheeler C, Koutsky L, Garland S, Leodolter S. Incidence, duration, and reappearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in young women. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(6): 1585-1594. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-1235>
9. Instituto Nacional de Cancerología. Guías de práctica clínica en enfermedades neoplásicas: Instituto Nacional de Cancerología; 2001. 2ª Edición. Bogotá, Colombia. <https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/Guias>.
10. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(6): 1471-1474. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
11. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (editors). DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 11th Edition. Washington, DC: Wolters Kluwer; 2018.
12. Bullock MJ. Current challenges in the staging of oral cancer. *Head Neck Pathol*. 2019; 13(3): 440-448. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01014-4>.
13. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(3): 127-133. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x>.
14. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000; 19(1-2): 1-5. [http://doi.org/10.1016/s1386-6532\(00\)00125-6](http://doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00125-6).

15. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; 11: 2286-2302. <http://doi.org/10.2741/1971>.
16. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32: 7-15. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.006>.
17. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007; 98(10): 1505-1511. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>.
18. Johung K, Goodwin EC, Dimaio D. Human papillomavirus E7 Repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *J Virol.* 2007; 81(5): 2102-2116. <http://doi.org/10.1128/JVI.02348-06>.
19. Shai A, Brake T, Somoza C, PF L. The human papillomavirus E6 Oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res.* 2007; 67(4): 1626-1635. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3344>.
20. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis. *J Pathol.* 2007; 212(4): 355-367. <http://doi.org/10.1002/path.2192>.
21. Constandinou-Williams C , Collins SI, Roberts S, YoungLS, Woodman CB, PG. M. Is human papillomavirus viral load a clinically useful predictive marker: a longitudinal study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(3): 832-837. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0838>.
22. Nichols A, Dhaliwal S, Dowthwaite S, Siddiqui I, Venkatesan V, Todorovic B, et al. Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013; 42(1): 9. <http://doi.org/10.1186/1916-0216-42-9>.

23. Leemans C, Braakhuis J, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(1): 9-22. <http://doi.org/10.1038/nrc2982>.
24. Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi S, et al. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep*. 2007; 17(4): 931-939.
25. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005; 32(Suppl 1): S16-S24. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.008>.
26. Huang SS, Hao DZ, Zhang Y, Liu HM, Shan WS. Progress in studies of the mechanisms and clinical diagnosis of cervical carcinoma associated with genomic integration of high-risk human papillomavirus DNA. *Yi Chuan*. 2017; 39(9): 775-783. <http://doi.org/10.16288/j.ycz.17-151>.
27. Speel EJ. HPV Integration in head and neck squamous cell carcinomas: cause and consequence. Recent results. *Cancer Res*. 2017; 206: 57-72. http://doi.org/10.1007/978-3-319-43580-0_4.
28. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(1): 11-22. <http://doi.org/10.1038/nrc2050>.
29. Kreimer A, Clifford G, Boyle P, S. F. Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(2): 467-475. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>.
30. Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, Baena A, Lopez C, Alvarez E, et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013; 79(3): 375-381. <http://doi.org/10.5935/1808-8694.20130065>.
31. Ordóñez D AN, García L, Collazos P, Bravo L. Oral cancer in Cali, Colombia: a population-based analysis of incidence and mortality trends. *Salud Publica de Mex*. 2014; 56(5): 465-472.

32. Ereira A, Motta LA, Chala A, Moreno A, Gamboa F, Garcia DA. Genotyping, levels of expression and physical status of human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma among Colombian patients. *Biomedica*. 2015; 36(0): 14-24. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2912>.
33. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010; 192(19): 5002-5017. <http://doi.org/10.1128/JB.00542-10>.
34. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*. 2012; 18(2): 109-120. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>.
35. Sonnenburg J, Fischbach MA. Community health care: therapeutic opportunities in the human microbiome. *Sci Transl Med*. 2011; 3(78): 78ps12. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001626>.
36. Simonetti AC, Melo JH, de Souza PR, Brunaska D, de Lima Filho JL. Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. *Microbes Infect*. 2009; 11(4): 435-442. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.01.004>.
37. Ahn J, Chen CY, Hayes RB. Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2012; 23(3): 399-404. <http://doi.org/10.1007/s10552-011-9892-7>.
38. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol*. 1998. 34(4): 304-308.
39. Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci. Rep*. 2017; 7(1): 11773. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-11779-9>.
40. Al-Hebsni NN, Nasher AT, MY M, Homeida HE, Chen T, Idris AM, et al. Inflammatory bacterium featuring *Fusobacterium nucleatum* and *pseudomonas aeruginosa* indentified in

association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1834.
<http://doi.org/10.1038/s41598-017-02079-3>.

41. Chang C, Geng F, Shi X, Li Y, Zhang X, Zhao X, et al. The prevalence rate of periodontal pathogens and its association with oral squamous cell carcinoma. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(3): 1393-1404. <http://doi.org/10.1007/s00253-018-9475-6>.
42. Pushalkar S, Mane SP, Ji X, Li Y, Evans C, Crasta OR, et al. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma. *FEMS Immunol Med Cancer.* 2011; 61(3): 269-277. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00773.x>.
43. Hooper SJ, Crean SJ, Lewis MA, Spratt DA, Wade WG, Wilson MJ. Viable bacteria present within oral squamous cell carcinoma tissue. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5): 1719-1725. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1719-1725.2006>.
44. Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 144. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-144>.
45. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med.* 2005; 3: 27. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>.
46. Hooper SJ, Crean SJ, Fardy MJ, Lewis MA, Spratt DA, Wade WG. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 12): 1651-1659. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46918-0> p. 1651-9.

47. Morita E, Narikiyo M, Yano A NE, Igaki H, Sasaki H. Different frequencies of streptococcus anginosus infection in oral cancer and esophageal cancer. *Cancer Sci.* 2003; 94(6): 492-496. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01471.x>.
48. Sasaki M, Yamaura C, Ohara -Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T. Streptococcus anginosus infection in oral cancer and its infection route. *Oral Dis.* 2005; 11(3): 151-156. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01051.x>.
49. Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2010; 31(4): 126-131. <http://doi.org/10.4103/0971-5851.76195>.
50. Tao L, Pavlona SI, Gasparovich SR, Jin L, Schwartz J. Alcohol metabolism by oral streptococci and interaction with human papillomavirus leads to malignant transformation of oral keratinocytes. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 815: 239-264. http://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_14.
51. Schwartz J, Pavlona S, Kolokythas A, Lugakingira M, Tao L, Miloro M. Streptococci-human papilloma virus interaction with etanol exposure leads to keratinocyte damage. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(8): 1867-1879. <http://doi.org/10.1016/j.joms.2011.08.005>.
52. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis infection-associated risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(13): e3077. <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000003077>.
53. Robayo DAG, Erira HAT, Jaimes FOG, Torres AM, Galindo AIC. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: human papilloma virus coinfection with streptococcus anginosus. *Braz Dent J.* 2019; 30(6): 626-633. <http://doi.org/10.1590/0103-6440201902805>.