

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

**“Perfil mutacional de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello
asociado a virus de papiloma humano en pacientes mexicanos”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Maria Fernanda Peralta Gonzalez

Matrícula: 2223803069

Correo: feerper22@gmail.com

Comité tutorial

Directora: **Dra. Patricia Piña Sánchez**

Co-directora: **Dra. Roxana Uri Miranda Labra**

Asesora: **Dra. Maria del Rosario Castro Oropeza**

Jurado

Presidente: **Dr. Edmundo Bonilla Gonzalez**

Secretaria: **Dra. Maria del Rosario Castro Oropeza**

Vocal: **Dr. Francisco Javier Gaytan Cervantes**

Vocal: **Dra. Gisela Ceballos Cancino**

Iztapalapa, Ciudad de México, 25 de marzo del 2025.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT CVU: 1255577, en el periodo 2022-2024.

Este trabajo forma parte del protocolo titulado “Validación de biomarcadores asociados al desarrollo y pronóstico de neoplasias atribuidas a la infección del Virus del Papiloma Humano”, con número de registro R-2017-3602-31, y se llevó a cabo gracias al apoyo financiero del Instituto Mexicano del Seguro Social a través la convocatoria Temas Prioritarios de Salud, Población Vulnerable y Temas Emergentes, en el rubor Cáncer/neoplasias malignas 2023.

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Perfil mutacional de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello asociado a virus de papiloma humano en pacientes mexicanos “, que presentó

Maria Fernanda Peralta González

El día 25 de marzo del año 2025

JURADO

Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM Iztapalapa.

Secretaria

Dra. Maria del Rosario Castro Oropeza

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. CMN SXII, IMSS.

Vocal

Dr. Francisco Javier Gaytán Cervantes

Laboratorio de Secuenciación, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS.

Vocal

Dra. Gisela Ceballos Cancino

Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, INMEGEN.

Directora Dra. Patricia Piña Sánchez

Laboratorio de Oncología Molecular

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI. IMSS.

e-mail: patricia_1307@yahoo.com.mx

Co- directora Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Laboratorio de Fisiología Celular y Medicina Traslacional.

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I

e-mail: rox_miranda20@hotmail.com

Asesora Dra. Maria del Rosario Castro Oropeza

Laboratorio de Oncología Molecular

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI. IMSS.

e-mail: rosariocastrooropeza@gmail.com

Dedicatorias

*A mi mamá, porque siempre me has impulsado,
sostenido y abrazado a cada paso que doy,
sin importar que tan complicado se torne el camino.
Todos mis logros son tuyos.*

*A mi Poli y Olivia, mis compañeras
de largas noches de lectura y trabajo.*

*A MariFer, porque a veces no dimensionas
todo lo que has logrado,
sigue soñando en grande.*

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Piña Sánchez, por darme la oportunidad de trabajar e integrarme en el Laboratorio de Oncología Molecular. Por facilitarme todas las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto e impulsar mi desarrollo académico. Sus atribuciones, consejos y enseñanzas fueron y siguen siendo enriquecedoras.

A la Dra. Maria del Rosario Castro Oropeza, por impulsarme a ser mejor cada día, por siempre ser paciente y contribuir con su conocimiento. Por compartir conmigo su pasión por la ciencia y ser una fuente constante de admiración. Por contagiarme de su alegría y optimismo aun cuando los experimentos se complicaban.

A la Dra. Roxana Miranda Labra, por confiar en mí y en mi trabajo. Por su disposición constante y valiosas atribuciones para la mejoría de mi desarrollo profesional. Por motivarme a seguir el camino de la investigación.

Al Dr. Javier Gaytán y Dra. Carolina González en conjunto el laboratorio de Secuenciación del CMN, SXXI. Por las facilidades para hacer uso de las instalaciones. Por enseñarme las técnicas experimentales y compartir su experiencia. Por ser pacientes y aconsejarme para obtener resultados exitosos.

A mis amigas científicas, Perla, Anaid, Jaqueline, Maricruz, Dayra, Alejandra, Patsy; porque rodearme de ustedes me motiva a ser mejor y me inspira. Me enorgullece haber podido aprender de ustedes en algún momento de mi camino académico. Por ser una red de apoyo con sus pláticas y consejos.

Resumen

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) presentan una variedad de características biológicas y clínicas, influenciadas en parte, por su asociación con el virus del papiloma humano (VPH). En general, los HNSCC VPH positivos tienen un mejor pronóstico en comparación con los VPH negativos. Para la estadificación de los carcinomas de orofaringe, la sobreexpresión de p16 se utiliza como un marcador subrogado de la transformación inducida por VPH. Sin embargo, aproximadamente 20% de los casos presentan discordancia entre la expresión de p16 y detección de VPH, lo que hace que este subgrupo de tumores sea poco comprendido. Los estudios moleculares en HNSCC se han enfocado en describir el perfil mutacional basándose en el estatus de VPH positivo o negativo, identificando diferencias en la carga mutacional en genes supresores de tumores. No obstante, hasta la fecha, en México no existen estudios sobre la biología molecular de los HNSCC considerando tanto el estatus de VPH como la expresión de p16. En este trabajo, se utilizó secuenciación de nueva generación, dirigida a genes con potencial accionable utilizando biopsias de la UMAE del Hospital de Oncología, CMNS XXI. Las variantes somáticas se clasificaron por su impacto clínico según la ACMG/AMP. El 87.3% de las variantes fueron de significado incierto, mientras que el 12.7% fueron posiblemente patogénicas. Se identificaron variantes somáticas en *PIK3CA*, *EGFR*, *HRAS*, *FGFR4*, *DDR2*, *MYC*. *PIK3CA* fue el gen más mutado en el grupo VPH positivo. Además, ciertas variantes afectaron la estructura proteica, mientras que el análisis de variantes intrónicas indicó que no hay afectaciones en el empalme (splicing) de ARNm.

Abstract

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) exhibit a variety of biological and clinical characteristics, influenced in part by their association with the human papillomavirus (HPV). In general, HPV-positive HNSCC cases have a better prognosis compared to HPV-negative cases. For oropharyngeal carcinoma staging, p16 overexpression is used as a surrogate marker of HPV-induced transformation. However, approximately 20% of cases show discordance between p16 expression and HPV detection, making this subgroup of tumors poorly understood. Molecular studies in HNSCC have focused on describing the mutational profile based on HPV-positive or HPV-negative status, identifying differences in the mutational burden of tumor suppressor genes. However, to date, no studies in Mexico have explored the molecular biology of HNSCC considering both HPV status and p16 expression. In this study, next-generation sequencing was used to target actionable genes using biopsies from the UMAE of the Oncology Hospital, CMNS XXI. Somatic variants were classified based on their clinical impact according to ACMG/AMP guidelines. A total of 87.3% of the variants were of uncertain significance, while 12.7% were potentially pathogenic. Somatic variants were identified in PIK3CA, EGFR, HRAS, FGFR4, DDR2, and MYC, with PIK3CA being the most frequently mutated gene in the HPV-positive group. Additionally, certain variants affected protein structure, while the analysis of intronic variants indicated no impact on mRNA splicing.

Índice general

Introducción	1
Antecedentes	14
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Pregunta de investigación	18
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	19
Materiales y métodos	19
<i>Selección de muestras</i>	19
<i>Expresión de p16</i>	22
<i>Detección y genotipificación de VPH</i>	23
<i>Purificación de ADN</i>	24
<i>Evaluación de la integridad de ADN</i>	24
<i>Secuenciación de nueva generación (NGS) por Ampliseq Illumina Focus Panel</i>	24
<i>Procesamiento, análisis de datos de secuencia y control de calidad</i>	26
<i>Alineación Burrows-Wheeler (BWA)</i>	26
<i>Análisis de llamado de variantes</i>	26
<i>Predicción bioinformática</i>	27
Resultados	27
<i>Caracterización de muestras clínicas de carcinomas escamosos de cabeza y cuello</i>	27
<i>Secuenciación de panel dirigido en bloques FFPE de HNSCC</i>	30
<i>Análisis de variantes somáticas en muestras en FFPE de HNSCC</i>	33
<i>Frecuencia mutacional de los genes mutados en HNSCC de pacientes mexicanos</i>	35
<i>Perfil mutacional de los HNSCC en pacientes mexicanos</i>	37
<i>Características clínicas y mutaciones génicas en los HNSCC de pacientes mexicanos</i>	39
<i>Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos en HNSCC de pacientes mexicanos</i>	41
<i>Alteraciones estructurales y score de patogenicidad de las variantes</i>	43
<i>Vías alteradas en pacientes mexicanos con HNSCC asociados a VPH</i>	46
<i>Evaluación del impacto de variantes intrónicas en el empalme del ARN</i>	48

Discusión	51
Conclusiones	61
Referencias	63

Introducción

El cáncer es el conjunto de enfermedades en el que las células normales de un tejido, a través de alteraciones genéticas y epigenéticas, proliferan de forma anormal adquiriendo un fenotipo maligno con potencial para evadir la muerte celular y, en ocasiones, diseminarse de un órgano a otro (OMS, 2022).

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, las estadísticas del 2022 según el Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN) indicaron que cerca de 20 millones de casos nuevos son diagnosticados al año y que al menos el 50% de los pacientes fallecen a causa de esta enfermedad. Si bien, los cánceres más frecuentes a nivel global son cáncer de mama, próstata, colon, pulmón e hígado, por otro lado, los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) son menos frecuentes, pero altamente discapacitantes, esto debido a su localización, afectando significativamente la calidad de vida de los pacientes (GLOBOCAN, 2022).

Según el GLOBOCAN, para el 2022 se reportaron aproximadamente, más de 900,000 casos nuevos y 480,000 muertes en todo el mundo por HNSCC. Entre los sitios anatómicos más frecuentes, la cavidad oral tiene una tasa de incidencia y mortalidad de 4 y 1.9 por cada 100,000 habitantes, respectivamente. La laringe y orofaringe son el segundo y tercer sitio más frecuente, respectivamente. En el mismo año, en México, se registraron 1,500 casos nuevos de cáncer de labios y cavidad oral con 586 muertes,

lo que representa una tasa de incidencia y mortalidad del 1 y 0.43 por cada 100,000 habitantes, respectivamente.

Los HNSCC son un grupo de neoplasias malignas que afectan a las células escamosas de las mucosas del tracto aerodigestivo superior. Los principales sitios en donde se desarrollan estos tumores son labios, cavidad oral, orofaringe, cavidad nasal, nasofaringe, hipofaringe, laringe y senos paranasales. Como ocurre con otros tipos de cáncer, el HNSCC sigue una serie de pasos para su desarrollo, desde mutaciones en genes, que pueden ser causadas por la exposición a carcinógenos, hasta la desregulación de procesos metabólicos claves para la homeostasis celular (Stegeman, H., et al., 2013).

Las manifestaciones clínicas de estos tumores pueden variar según el sitio anatómico, pero en general, suelen ser asintomáticos en las etapas iniciales del desarrollo. Por ejemplo, los tumores desarrollados en la cavidad oral llegan a manifestarse generando ulceraciones persistentes, esto se puede observar cómo leucoplasia, eritroplasia o leucoplasias moderadas, pese a esto, son diagnosticados en etapas avanzadas (Owens, D., et al. 2022).

Según la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los factores etiológicos dominantes para el desarrollo de estas neoplasias son el tabaco y alcohol. Adicionalmente, algunos virus oncogénicos como el virus de Epstein-Barr (VEB), han sido asociados con una alta incidencia de carcinomas nasofaríngeos. Mientras que el Virus del Papiloma Humano (VPH) es principalmente asociado con la carcinogénesis

orofaríngea, sin embargo, su participación en el desarrollo tumoral de otros sitios de la cabeza y el cuello ha ido en aumento en los últimos años (Chaturvedi, A., et al. 2011; Jun, H., et al. 2022). Particularmente, los pacientes con HNSCC asociados a VPH suelen ser más jóvenes y tienen un pronóstico más favorable (Gallegos, J., et al. 2010). La edad promedio de diagnóstico global para HNSCC es de 50 a 70 años, mientras que para los pacientes con HNSCC asociados a VPH suele ser antes de los 50 años (Giraldi, L., et al. 2021).

Aproximadamente, el 4% de todos los casos de HNSCC a nivel mundial están asociados al consumo prolongado de alcohol, mientras que, el ~33% es causados por la exposición crónica al tabaco. El consumo en conjunto de estos dos carcinógenos es responsable del 35% de los HNSCC, por lo tanto, ~25% de los tumores son causados por el VPH (Hashibe, M., et al. 2009).

La prevalencia de estas neoplasias malignas es diferente en distintas poblaciones del mundo, por ejemplo, en el Sudeste Asiático y Australia los HNSCC están principalmente asociados a carcinógenos contenidos en el tabaco y betel, mientras que en EE.UU y Europa Occidental la alta prevalencia de estos tumores es dada por el incremento en las tasas de infección por VPH (Hashibe, M., et al. 2007; Giraldi, L., et al. 2021).

La infección por VPH es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes a nivel mundial. El VPH es un virus de ADN bicatenario con un genoma circular de ~8000 pares de bases. Se conocen más de 200 genotipos de VPH, clasificados en alto y bajo riesgo, según su riesgo oncológico asociado. En México, los genotipos de alto riesgo

más frecuentes en HNSCC son 16, 18, 39, 52, 31, 58, 66, 53, 33, 35, 56, 58 (Méndez, G., et al, 2021).

El genoma de VPH codifica para ocho proteínas diferentes (Figura1). Seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y dos genes tardíos (estructurales): L1 y L2. Las proteínas de los genes tardíos son necesarias para el ensamblaje viral, mientras que E1, E2 y E4 son necesarias para la replicación viral y la regulación de la replicación. E6 y E7 son responsables de la mayoría de los efectos carcinógenos de los genotipos de VPH de alto riesgo. El VPH principalmente promueve la carcinogénesis mediante la inestabilidad genómica y la inhibición de genes supresores de tumores (Schwartz, S., 2013).

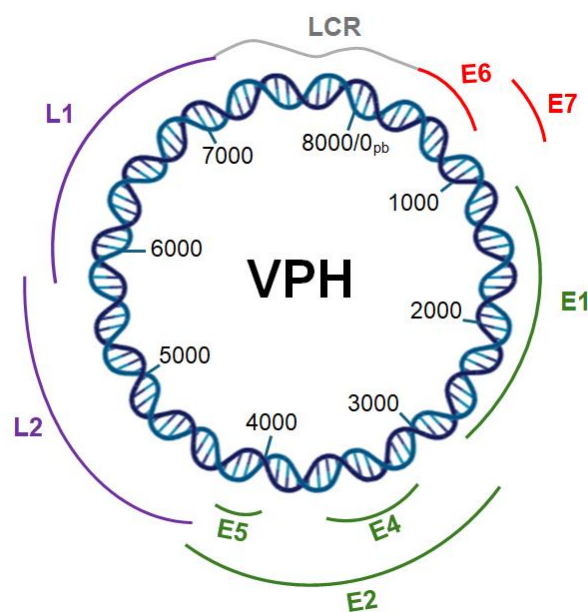


Figura 1. Representación esquemática del genoma del Virus del Papiloma

Humano. Elaborada por Peralta-González, MF. 2025.

En un escenario de infección persistente de VPH, E6, inhibe al supresor de tumores p53 al promover su degradación vía proteasoma. Mientras que, E7 se une a la proteína retinoblastoma (Rb). En su forma no fosforilada, Rb se une al factor de transcripción E2F, impidiendo que E2F active la transcripción de los genes necesarios para que la célula pase de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Cuando E7 se une directamente a Rb, impide la unión de Rb con E2F, como resultado, E2F se libera y activa constantemente el ciclo celular en la capa basal del epitelio y la inducción p16^{INK4A}, un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, generando un bucle de retroalimentación (Tomaić, V., 2016) (Figura 2). Por otro lado, la sobre expresión de p16^{INK4A} en tumores asociados a VPH también es dada por la regulación positiva de la desmetilasa KDM6B conduciendo a una disminución de los niveles de marcas represivas de H3K27me3 en la región promotora del gen *CDKN2A*, codificante para p16^{INK4A} (McLaughlin, M., et al. 2011). Por este mecanismo de regulación, se considera a p16 como marcador subrogado de la infección de VPH, en especial para los tumores orofaríngeos (Robinson, M. 2017).

La determinación de p16 en tejidos de tumores fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE) usualmente se realiza con inmunohistoquímica (IHQ), la positividad de esta proteína se define como al menos el 70% de las células tumorales con inmunorreactividad nuclear y citoplasmática difusa de p16 de moderada a fuerte. Sin embargo, las directrices para determinar el estatus del VPH no están establecidas, por lo tanto, la detección de VPH varía según el país. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida a las regiones GP5+/GP6+ del VPH, en conjunto con la

IHQ, tiene una exactitud del 98% en tumores orofaríngeos (Rietbergen, M., et al. 2013). De esta forma, los HNSCC clasificados mediante IHQ y PCR son VPH positivos o negativos (VPH+/p16+, VPH-/p16-, respectivamente).

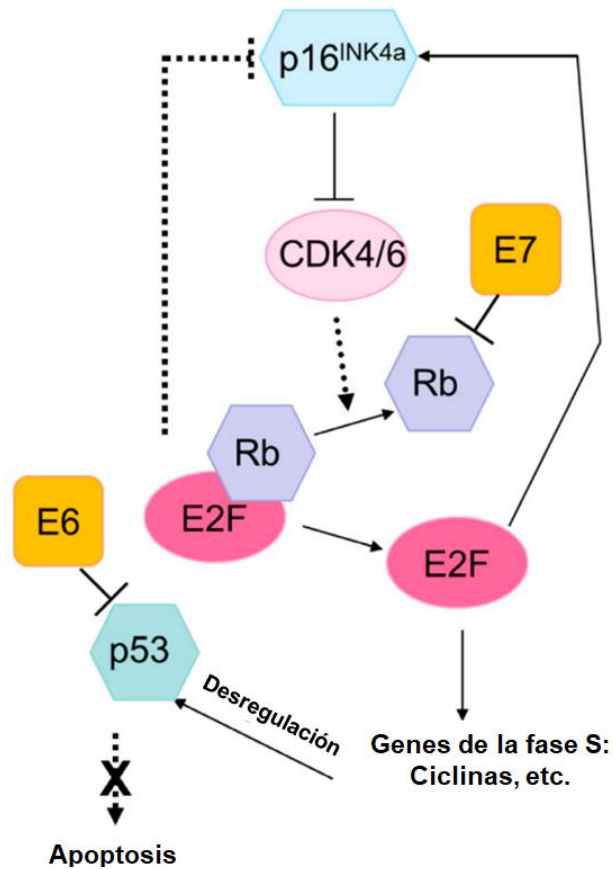


Figura 2. Mecanismos carcinogénicos mediado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Imagen obtenida y modificada de Litwin, T., et al. 2017.

La importancia de p16 como marcador subrogado, en la clínica, se ha visto reflejado en la estadificación TNM (Tumor, Ganglio linfático, Metástasis) establecido en por el American Joint Committe Cancer (AJCC). Estos lineamientos proporcionan un marco para determinar el pronóstico y diseñar un tratamiento basado en pautas para cada etapa. En el 2017, la 8va edición de la AJCC implementó un sistema de estadificación para cáncer orofaríngeo con el objetivo de diferenciar a los tumores VPH positivos y negativos, basado en la expresión de p16. La estadificación N se simplificó para eliminar subcategorías innecesarias y se eliminó el concepto extraganglionar (ENE). En conjunto, estas modificaciones disminuyen el número de tumores VPH positivos clasificados en estadios IV. Mientras que para los tumores orofaríngeos VPH negativos, se mantiene una clasificación estricta con tratamientos más agresivos.

Con base a las consideraciones anatómicas y la estadificación TNM de la 8va edición, la terapia estándar para los pacientes con HNSCC en estadio temprano (estadios I y II), involucra tratamientos menos agresivos con menor morbilidad y efectos adversos como disfagia y toxicidad a largo plazo, tales como, cirugía o radioterapia (RT). De esta forma, alrededor del 80% al 90% de los pacientes en etapa temprana entran en remisión en un tiempo de 5 años (Pfister, D., et al. 2015). Por otro lado, los pacientes en estadio avanzado (estadios III y IV) se tratan con terapia multimodal, que incluye cirugía, RT y quimioterapia a base de platino (cisplatino). A pesar del tratamiento más agresivo para la enfermedad en estadio avanzado o de difícil acceso, las tasas de remisión siguen siendo bajas, principalmente debido a la recurrencia locorregional (Kato, M., et al. 2020).

A pesar de la respuesta inicial a la terapia, las células cancerosas desarrollan resistencia al cisplatino, lo que finalmente conduce al fracaso del tratamiento (Ferreira, J., et al. 2016). En 2016, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó los fármacos Nivolumab, Pembrolizumab y Cetuximab en pacientes con HNSCC resistentes al cisplatino (Seiwert, T., et al. 2016; Bonner, J., et al. 2006). Sin embargo, no todos los tumores responden de la misma forma a la terapia convencional debido a que los HNSCC son tumores altamente heterogéneos, impulsados por la inestabilidad genómica (Boora, G., et al. 2022).

La inestabilidad genómica es una característica distintiva del cáncer o *hallmark*, por su término en inglés, y se refiere a la propiedad de las células cancerosas, a ser genéticamente más inestables debido a la rápida división celular y, en última instancia, a una mayor tendencia a la alteración del ADN durante este proceso. Se ha demostrado que el inicio y la progresión tumoral se asocian con la alteración genómica adquirida en células normales (Hanahan & Weinberg, 2000).

Las mutaciones son alteraciones en la secuencia nucleotídica del ADN que pueden clasificarse en *somáticas*, cuando son adquiridas a lo largo de la vida, o *germinales*, cuando son heredadas. Estas variaciones pueden ocurrir en diferentes escalas, desde un único cambio una sola base hasta la alteración de múltiples genes.

Desde el punto de vista estructural, se pueden clasificar como *extragénicas*, *génicas*, *cromosómicas*, y *genómicas*, dependiendo la región afectada. Las variantes genéticas, en particular en la región codificante de un gen, tienen efecto drástico que conduce al desarrollo de diversas enfermedades y anomalías físicas. La mayoría de los cánceres,

alrededor del 90%, son causados por mutaciones somáticas y factores ambientales (Sawyer, S., et al. 2007).

En particular, las mutaciones dentro de regiones codificantes a proteínas se clasifican en dos grandes grupos: *sinónimas* y *no sinónimas*. Las variantes sinónimas son aquellas en las que la sustitución no implica un cambio en la secuencia aminoacídica, también son conocidas como *silenciosas*. Por otro lado, las variantes no sinónimas sí implican un cambio en la secuencia codificante. Pueden ser *truncantes* o *sin sentido* cuando una sustitución codifica para un codón de paro, indicando así la terminación de la secuencia y por lo tanto de la proteína. Adicionalmente, pueden ser variantes de cambio de marco de lectura o variantes en el sitio de corte y empalme (Sawyer, S., et al. 2007).

Desde otro punto de vista, las variantes se clasifican dependiendo su patogenicidad asociada. Desde el 2015, el sistema diseñado por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, por sus siglas en inglés) se ha convertido en el sistema predominante para la clasificación de las variantes. La ACMG estableció un conjunto de recomendaciones para sopesar la evidencia que presenta cada variante, llegando así a una clasificación estandarizada. Las 5 categorías establecidas son: benigna (B), probablemente benigna (LB), variante de significado desconocido (VUS), probablemente patógena (LP) y patógena (P) (Richards, S., et al. 2015).

Sumado a esto, en el 2017, la Asociación de Patología Molecular (AMP, por sus siglas en inglés) estableció la clasificación *Tier*, enfocada al impacto clínico. Esta clasificación es únicamente para las variantes somáticas en el contexto de cáncer y su

categorización se basa en valor diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico. Las variantes Tier I, son las que cuentan con mayor evidencia clínica. Las Tier II indican posible importancia clínica, la categoría Tier III hace referencia a las variantes con significado incierto y, finalmente, las Tier IV son aquellas sin relevancia clínica (Parikh, B., et al. 2020).

En conjunto, el uso de estas clasificaciones ha permitido identificar los perfiles mutacionales en los diferentes procesos fisiopatológicos, dichos perfiles varían entre tumores y tipos de cáncer. En este contexto, las mutaciones reportadas particularmente en oncogenes y genes supresores de tumores son cada vez más importantes para el tratamiento de los pacientes con cáncer. Debido a la estrecha relación entre la inestabilidad genómica, caracterizada por un gran número de mutaciones, y la resistencia al tratamiento en pacientes con HNSCC, múltiples investigaciones han identificado los cambios en el genoma atribuidos al VPH.

La integración del VPH en la célula huésped genera alteraciones estructurales en el genoma, las variaciones en el número de copias con frecuencia se localizan en sitios específicos de integración viral, incluso, se ha demostrado que estas alteraciones varían según el genotipo de VPH (Rusan, M., et al. 2015). En consecuencia, se han identificado inversiones, duplicaciones, deleciones en el genoma (Akagi, K., et al. 2014). En particular, se han observado alteraciones con mayor frecuencia en los cromosomas 3 y 8, incluyendo pérdidas en 3p y ganancias en 3q. En los HNSCC, la región 3q26-28 se amplifica tanto en los cánceres positivos como en los negativos a VPH, mientras que las deleciones en 3p se encuentran principalmente en los tumores

negativos a VPH (Seiwert, T., et al. 2015). De igual forma, en los carcinomas escamosos de vulva positivos a VPH se identifican ganancias en el 3q (55%), pérdidas en el 3p (36%) y pérdidas en el 11q (33%) (Thomas, L., et al. 2014).

Respecto a las alteraciones genéticas puntuales, la cantidad de mutaciones genéticas encontradas en el ADN de las células cancerosas, conocida como carga mutacional, es diferente entre los cánceres asociados a VPH. Por ejemplo, en cáncer de pene y vulva positivos a VPH, se ha reportado una menor carga de mutaciones somáticas principalmente en genes supresores de tumores como *TP53*, en comparación con los no asociados a VPH (McDaniel, A., et al. 2015; Kortekaas, K., et al. 2020). Adicionalmente, las firmas mutacionales específicas están diferencialmente representadas en los cánceres positivos a VPH en comparación con los negativos. La firma de la mutación del polipéptido catalítico de edición de ARNm de apolipoproteína B (APOBEC), en particular, es muy común en los cánceres positivos para el VPH, desencadenada por la respuesta del huésped a la infección por VPH (Warren, C., et al. 2015).

Hasta la fecha, la mayoría de estas descripciones moleculares se ha basado en la comparativa entre los HNSCC VPH positivos o negativos, sin embargo, con la nueva implementación de la AJCC en donde se considera a la expresión de p16 como marcador subrogado, hasta el 20% de los pacientes que tienen tumores p16 positivos dan negativo en las pruebas de detección de VPH (Hoffmann, M., et al. 2012; Méndez, M., et al. 2021). Los HNSCC discordantes VPH+/p16- y VPH-/p16+ no han sido estudiados a nivel molecular ni biológico. Se plantea la hipótesis de que los tumores

VPH+/p16- probablemente hayan experimentado una infección transitoria por VPH, sin activación de efectos oncogénicos (Guzmán, A., & Nishino, M. 2022). Evidencia en cuanto a la supervivencia de los pacientes con tumores VPH-/p16+ demuestra que pueden comportarse de forma favorable, similar los tumores VPH+/p16+ (Figura 3B) (Alsbeih, et al. 2019). Por el contrario, otros estudios reportan la supervivencia es peor, como ocurre con los tumores VPH-/p16- (Perrone, F., et al. 2011) (Figura 3A). La falta de conocimiento sobre este grupo de tumores discordantes limita tener estimaciones sobre la respuesta al tratamiento, en comparación con los HNSCC VPH positivos o negativos.

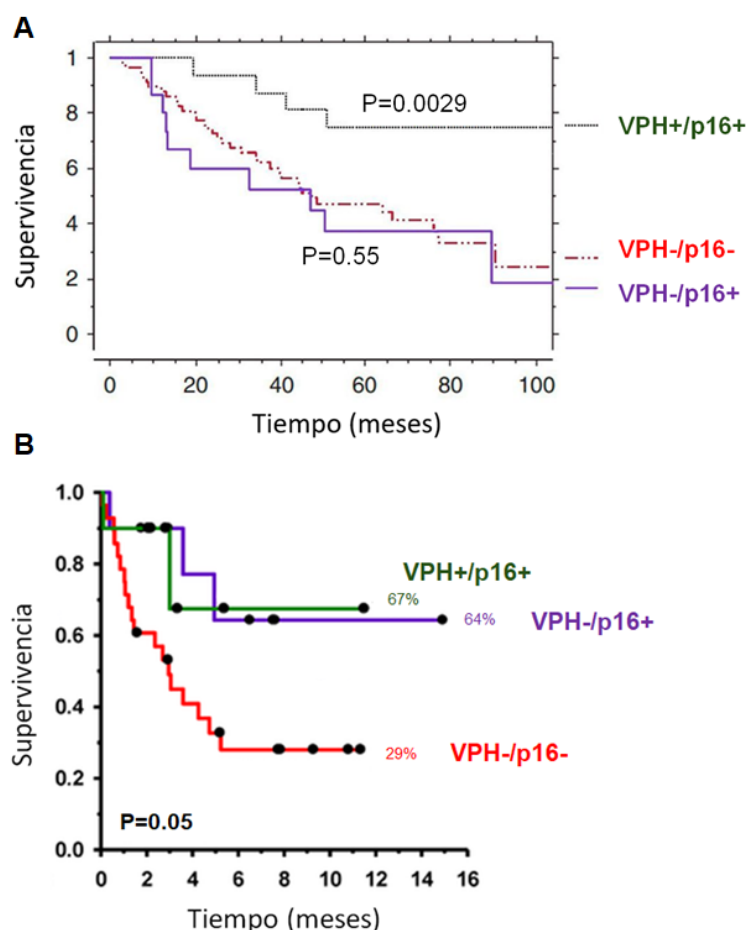


Figura 3. Comparativa de la supervivencia entre los tumores HNSCC discordantes respecto a los tumores dobles positivo y negativos. A) Supervivencia global de tumores orofaríngeos. **B)** Supervivencia global de tumores de tumores de la cavidad oral y orofaringe. Imágenes obtenidas y modificadas de Perrone, F., et al. 2011; Alsbeih, G., et al. 2019.

Ante la creciente necesidad de implementar una medicina personalizada de precisión, basada en las características moleculares de cada tumor, los métodos moleculares tradicionales no son útiles para tales necesidades. Por lo tanto, en los últimos años la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) se ha vuelto cada vez más relevante. NGS permite una secuenciación paralela masiva de longitudes variadas de ADN o ARN en un periodo de tiempo relativamente corto con una alta precisión y amplia cobertura. Esta capacidad confiere a la NGS un gran potencial de aplicación en entornos clínicos. En cáncer, el ensayo NGS más utilizado para los pacientes es la secuenciación de panel dirigido. Los consorcios internacionales como la Red Nacional Integral del cáncer (NCCN, por sus siglas en inglés) proporcionan una lista de genes y mutaciones que podrían ser clínicamente significativos para el diagnóstico, el pronóstico, las terapias de diana molecular y las inmunoterapias (Jennings, L., et al. 2017).

Antecedentes

A nivel clínico, biológico y molecular, los HNSCC asociados a VPH son considerados como una enfermedad diferente a aquellos VPH negativos. Los HNSCC VPH positivos, además de tener un mejor pronóstico con un aumento en la supervivencia del 30% a 5 años (Gallegos, J., et al. 2010), suelen tener niveles de expresión diferencial entre estos dos grupos. Nuestro grupo de trabajo realizó una de las más grandes caracterizaciones en tumores de pacientes mexicanos con HNSCC, se caracterizaron 414 tumores primarios de orofaringe, laringe y cavidad oral, en cuanto a la presencia de VPH y expresión de p16. El 65.3, 17.4, 12.3 y 4.9%, de los tumores analizados fueron VPH-/p16-, VPH+/p16+, VPH-/p16+, VPH+/p16- respectivamente. Adicionalmente, se identificó un perfil transcripcional diferente entre los tumores VPH positivos y VPH negativos. Un total de 47 ARNm se regularon significativamente a la baja en pacientes con HNSCC VPH positivos, incluidos KLF10, ACTN1, CCND1, HIF1A, entre otros. Además, 4 ARNm se encontraron significativamente regulados al alza incluidos MYB y SYCP2 en tumores VPH positivos frente a los VPH negativos. La baja expresión de los transcritos KLF10 y ACTN1 se correlacionó con una mejor supervivencia en comparación con los que tenían una alta expresión de estos. Por otra parte, la expresión al alta de MYB y SYCP2 se asoció con una mejor supervivencia (Méndez, G., et al., 2021).

Dada las diferencias en el comportamiento de estos tumores, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo a nivel mundial para obtener información sobre la firma mutacional de los HNSCC. Mediante NGS, se han detectado alteraciones genéticas que podrían utilizarse para el descubrimiento y la optimización de dianas terapéuticas.

En el 2015, el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), realizó un análisis genómico detallado de 279 muestras de HNSCC. El perfil mutacional reveló que las mutaciones asociadas a HNSCC VPH negativos están significativamente enriquecidas en genes supresores de tumores incluidos *TP53* (84%) y *CDKN2A* (58%). Mientras que estos genes en tumores VPH positivos rara vez están mutados, con una frecuencia mutacional del 3% y 0% respectivamente (Figura 4). Adicionalmente, se encontró una ausencia de mutaciones en *TP53* en tumores con genotipos de VPH de alto riesgo en cánceres de laringe y esófago (Rajendra, S., et al. 2016).

Dentro de los principales genes con alteraciones se encuentra *PIK3CA*, este gen es parte de la vía PI3K/AKT/mTOR, la cual es frecuentemente interrumpida en varios tipos de cáncer. Esta vía involucra la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, el metabolismo de la glucosa, la síntesis de proteínas y la apoptosis. *PIK3CA* es el gen mutado con mayor frecuencia en los cánceres positivos para el VPH, con frecuencias que oscilan entre el 22 al 56 % en los cánceres de cabeza y cuello positivos para el VPH (TCGA, 2015).

Asimismo, la vía RAS/EGFR/ERK está implicada en la proliferación y supervivencia celular. El protooncogén KRAS, GTPasa (*KRAS*) tiene una tasa global de mutación en HNSCC del 6% (Seiwert, T., et al. 2015). Por el contrario, *EGFR* es un supresor tumoral en la misma vía, en la que se encuentran amplificaciones focales recurrentes en HNSCC VPH negativo (Lawrence, M., et al. 2015), al igual que en diferentes estudios realizados en países como Asia, China y Japón (Manda, S, et al., 2024; Ju, et al., 2021; Maruyama, et al., 2014). Otros genes de la vía RAS/EGFR/ERK como

FGFR2 y *FGFR3* se encuentran mutados entre el 10% y 17% de los tumores VPH positivos (Bao, Y., et al. 2024).

Por otro lado, la vía de señalización Notch es responsable de la diferenciación celular. Las mutaciones en el receptor *NOTCH1* se encuentran tanto en HNSCC VPH negativos (12-26 %) como en los VPH positivos (6-17 %) (TCGA, 2015).

Las mutaciones identificadas principalmente en los receptores tirosina cinasa (RTK, por sus siglas en inglés), han servido como referencia para diseñar fármacos inhibidores de los RTKs (IRTK). En las últimas décadas, se ha utilizado Gefitinib, Erlotinib, Afatinib y Cetuximab para tratar a los HNSCC. Por ejemplo, Cetuximab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular del *EGFR*, sin embargo, hay mutaciones que activan constitutivamente mediadores de señalización río abajo de *EGFR*, en particular *KRAS*, se han asociado con la resistencia al cetuximab (Rampias, T., et al. 2014).

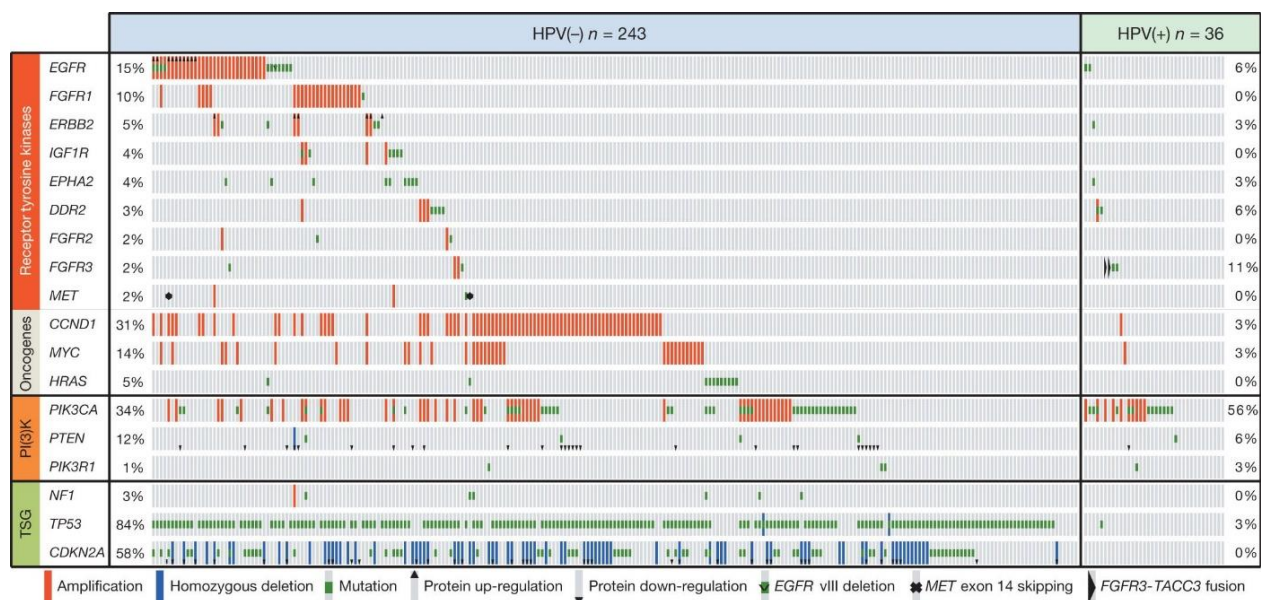


Figura 4. Caracterización genómica de los carcinomas escamosos de cabeza y cuellos según su estatus de VPH. Imagen obtenida de Lawrence, M., et. al, 2015.

Planteamiento del problema

Si bien, un perfil molecular integral conduce al desarrollo de la medicina personalizada o de precisión, en México, no existe un estudio genómico sobre HNSCC. Los estudios descriptivos sobre la biología molecular del HNSCC, como los del TCGA, se han basado en poblaciones predominantemente caucásicas (~80%). Mientras que los hispanos/ latinos, incluyendo mexicanos, representan menos del 5% en estos estudios (Spratt, D., et al. 2016). Factores como ascendencia genética, hábitos, exposición ambiental y acceso a la salud pueden influir en la genética de las poblaciones de estudio. Esto quiere decir que las alteraciones genómicas sobre HNSCC reportadas a nivel mundial no necesariamente pueden reflejar la biología molecular de este tipo de cáncer en la población mexicana, resultando en terapias dirigidas menos efectivas. Por lo tanto, describir la biología molecular de los HNSCC asociados a VPH en pacientes mexicanos permiten tener un mejor conocimiento sobre la enfermedad de nuestra población.

Justificación

Este estudio permitirá identificar por primera vez las alteraciones genéticas de tumores HNSCC asociados a VPH de pacientes mexicanos atendidos en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital del Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, confiriendo una gran ventaja al ser el centro de referencia y concentración oncológico más grande en todo el país. La descripción de las semejanzas y/o diferencias moleculares de los HNCSS posibilita la identificación de dianas terapéuticas para la intervención farmacológica y posibles biomarcadores pronóstico en la población mexicana.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las similitudes y diferencias genéticas en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello asociados a la presencia o ausencia del VPH y/o la expresión de p16?

Hipótesis

Los pacientes mexicanos con HNSCC no asociado a VPH presentan una mayor frecuencia de variantes somáticas en su perfil mutacional, en comparación con aquellos tumores que están asociados al VPH.

Objetivo general

Describir el perfil mutacional de pacientes mexicanos con HNSCC dependiente del estatus del VPH y p16.

Objetivos particulares

1. Caracterizar y clasificar los tejidos FFPE de pacientes con HNSCC en función del estatus de VPH y expresión de p16.
2. Identificar y clasificar las variantes genéticas asociadas con el HNSCC en la población mexicana de acuerdo con su impacto clínico en función de la presencia o ausencia de VPH.
3. Identificar semejanzas y diferencias de las variantes genéticas de los HNSCC VPH+/p16+, VPH-/p16- y discordantes.
4. Analizar el efecto de las variantes en la estructura y funcionalidad de la proteína mediante modelos bioinformáticos.

Materiales y métodos

Selección de muestras

Este trabajo forma parte del parte del proyecto registrado ante el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud número R- 2017-3602-31 del IMSS. El presente trabajo es de carácter descriptivo, retrospectivo y transversal, ya que como se observa en el esquema de trabajo de la figura 5, se partió de registros de patología de la UMAE del Hospital de Oncología en Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los casos recolectados fueron diagnosticados como HNSCC durante el período 2011-2023. Se consideraron ~800 muestras de tejidos tumorales FFPE de pacientes con diagnóstico de HNSCC de orofaringe, cavidad oral y laringe, de los cuales, se revisó que las biopsias tuvieran suficiente material biológico. Alrededor de 250 biopsias fueron seleccionadas para su

posterior caracterización respecto a la detección de VPH y expresión de p16. Aproximadamente 80 casos fueron VPH-/p16-, 100 casos fueron VPH+/p16+, 20 y 50 casos resultaron VPH+/p16-, VPH-/p16+, respectivamente. Posteriormente, la implementación de controles de calidad para secuenciación tuvo como objetivo evaluar la calidad del ADN de las muestras previamente caracterizadas, permitiendo seleccionar 27 muestras finales bajo los criterios de selección que se muestran en la tabla 1.

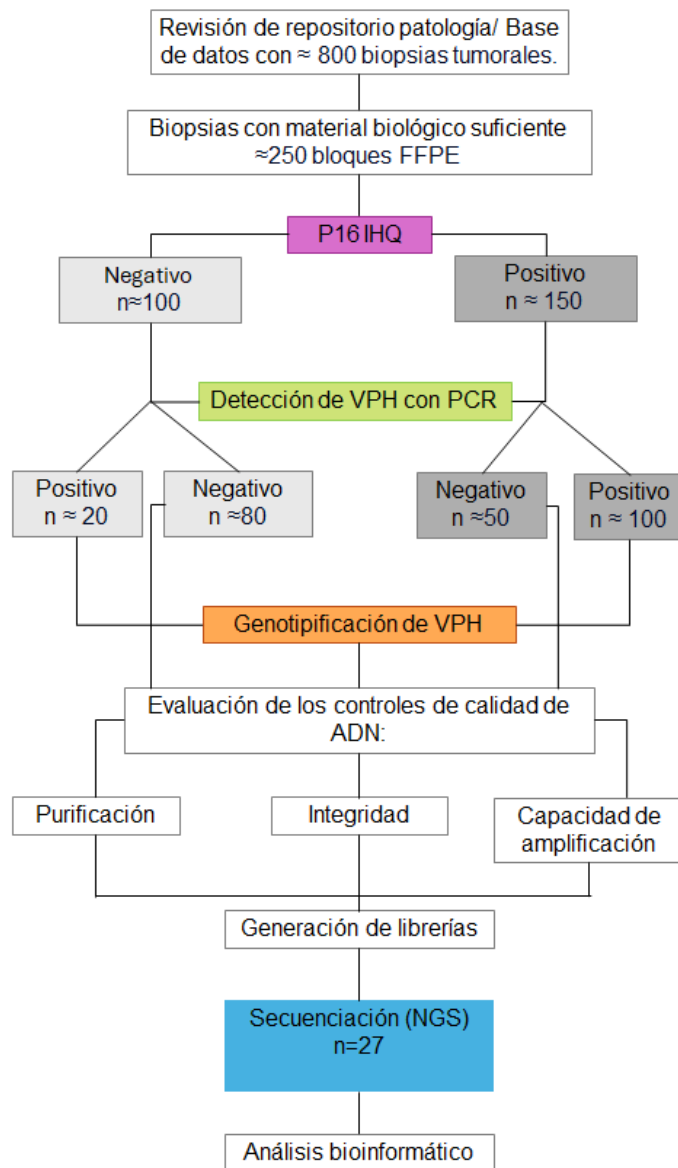


Figura 5. Diagrama general de la metodología empleada para identificar el perfil mutación de HNSCC asociados a VPH en pacientes mexicanos.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
• Pacientes con diagnóstico de tumor primario de HNSCC. • Pacientes mayores de 18 años. • Pacientes tratados en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. • Muestras con suficiente tejido tumoral en FFPE. • Muestras con información clínica disponible.	• Muestras de tumores con tratamiento previo a su recolección. • Insuficiente material biológico. • Muestras con genotipos de VPH de bajo riesgo.	• Muestras que no pasaron los controles de calidad establecidos (Concentración de ADN, relación 260/280, capacidad de amplificación, integridad de ADN). • Muestras sin adecuada construcción de librerías para secuenciación.

Tabla 1. Criterios utilizados para la selección de muestras HNSCC.

Expresión de p16

Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de grosor y se montaron en portaobjetos electro cargados (VWR). Se deshidrataron los tejidos mediante pases en alcoholes con concentraciones crecientes de alcohol (70-100%). Posteriormente se hizo la recuperación del antígeno con un procesador de tejido funcional rápido (KOS). Se bloqueo la proxidasa endógena con Blocking Reagent y se incubó con el anticuerpo monoclonal primario p16INK4a (clona E6H4) (Master diagnostica, MAD-000690QD)

en presentación listo para usar (RTU). Se añadió la peroxidasa Master Polymer Plus y después se reveló con sustrato criogénico diaminobenzidina (DAB), finalmente se hizo el contraste de la muestra con hematoxilina (DeLellis, R., 2021). Para el montaje de las laminillas, se realizó el proceso de hidratación del tejido mediante pases en alcoholes descendientes (100-70%), los portaobjetos se montaron sobre resina sintética. Las laminillas se observaron en un microscopio Leica DM750 y se clasificaron como p16 positivos cuando al menos el 70% de las células tumorales tenían una intensa reacción nuclear o citoplasmática.

Detección y genotipificación de VPH

Mediante observación al microscopio, las laminillas con tinción de hematoxilina- eosina (H&E), se delimitaron las áreas representativas del tumor, excluyendo tejido estromal. Posteriormente se usaron de cinco a seis cortes de 5 μ m para la extracción de ADN con el kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen, German- town, Maryland, USA). Se cuantificó el ADN con el espectrofotómetro de microplacas Epoch™ (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, USA). Posteriormente, se realizó la amplificación de la región L1 del VPH (150 pb) mediante PCR punto final, seguida de hibridación reversa para la genotipificación del virus a través del kit VPH Direct Flow CHIP (Máster Diagnostica, Granada, España). Este método permite la detección de 35 genotipos de alto y bajo riesgo, entre ellos VPH 16, 18, 31, 33, 35, 6, 11, 42, 43. De forma automatizada, el producto de PCR es hibridado en una membrana con sondas específicas para cada genotipo de VPH, la detección de la hibridación se hace mediante colorimetría.

Purificación de ADN

Con el objetivo de eliminar contaminantes y ADN altamente fragmentados, se llevó a cabo la purificación del ADN mediante el uso de perlas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.). Por cada muestra, se agregaron perlas magnéticas en una relación 1:1 con respecto al volumen inicial de la muestra. Las perlas se homogenizaron y luego se colocaron en un campo magnético. Una vez formado el pellet, se retiró el sobrenadante, se lavó con etanol al 80% y se secaron e hidrataron con Low TE. Finalmente se volvieron a colocar en el campo magnético y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó la cuantificación de ADN utilizando el espectrofotómetro Epoch™ (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU.).

Evaluación de la integridad de ADN

Con la finalidad de asegurar la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V. El resultado se observó en un fotodocumentador de geles con UV, y se seleccionaron las muestras de ADN con enriquecimiento mayor a 600 pb. Adicionalmente, se evaluó la calidad del ADN obtenido mediante qPCR. Se empleó el sistema LightCycler 480 de Roche.

Secuenciación de nueva generación (NGS) por Ampliseq Illumina Focus Panel

Se cuantificó el ADN purificado utilizando Qubit® 2.0 (Invitrogen). Posteriormente, las muestras se concentraron o diluyeron, según fuera el caso, para llegar a una concentración de 100-150 ng/μl en 12 μl. Se utilizó el panel *Ampliseq Focus for Illumina* para muestras FFPE (Illumina. Inc). Este panel incluye 52 genes de interés clínico para tumores sólidos, con potencial accionable (Tabla 2). Se generaron los amplicones mediante PCR multiplex, después se realizó la digestión de estos mismos

con el reactivo FuPa. Posteriormente, se hizo la ligación de los adaptadores Ampliseq[™] CD Indexes Set A, B, C for Illumina para cada muestra. Finalmente se hizo una purificación de librerías con perlas magnéticas Agencourt AMPure XP. Se corroboró la correcta construcción de librerías mediante Agilent TapeStation 2100 y Agilent D1000 HS (Agilent Technologies). Las librerías generadas se cuantificaron con Qubit® 2.0 (Invitrogen). Se preparó el pool final con todas las librerías a una concentración de 12 pM, este fue cargado en la *flow cell* v2 (Illumina, Inc). Finalmente se secuenció con la tecnología Miseq (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU). Los parámetros necesarios para tener datos de secuenciación confiables son 500x de profundidad y un alineamiento mayor al 80%.

AKT1	CTNNB1	ETV5	JAK1	MYCN	ROS1
AKT3	DDR2	FGFR1	JAK2	NRAS	SMO
ALB1	EGFR	FGFR2	JAK3	NTRK1	
ALK	ERBB2	FGFR3	KIT	NTRK2	
AR	ERBB3	FGFR4	KRAS	NTRK3	
AXL	ERBB4	GNA11	MAP2K1	PDGFRA	
BRAF	ERG	GNAQ	MAP2K2	PIK3CA	
CCND1	ESR1	HRAS	MET	PPARG	
CDK4	ETV1	IDH1	MTOR	RAF1	
CDK6	ETV4	IDH2	MYC	RET	

Tabla 2. Lista de genes del kit *AmpliSeq for Illumina Focus Panel* (Illumina, Inc. 2017).

Procesamiento, análisis de datos de secuencia y control de calidad

Se obtuvieron los datos de secuenciación de ADN, FASTQ, generados por el secuenciador MiSeq. Se utilizó el software FastQC v0.12.1, (desarrollado en Java) para evaluar la calidad de los archivos FASTQ. En el análisis del FastQC, por muestra, se evaluó la calidad de las bases (Q-score), indicativo de la confiabilidad de la lectura. La probabilidad de error en una base puede ser del 10, 1, 0.1% si están dentro del Q10, 20 o 30, respectivamente.

Alineación Burrows-Wheeler (BWA)

Utilizando *DNA Amplicon* de *BaseSpace Sequence Hub* se hizo el alineamiento con el genoma de referencia GRCh37 (hg19) utilizando BWA (versión 0.7.15-r1140). Este algoritmo ofrece la ventaja de alinear, tanto lecturas largas como lecturas cortas, con el genoma de referencia, además es altamente preciso ya que capaz de alinear lecturas con alta calidad y detectar pequeños errores de secuenciación, como inserciones y deleciones (indels), BWA posibilita el alineamiento incluso cuando existen huecos en la secuencia. Este proceso incluye varias etapas automáticas, entre las que se encuentra la conversión de archivos BAF (Base Alignment Format) a BAM (Binary Alignment Map). Finalmente, se obtuvieron los archivos de llamado de variantes (VCF).

Análisis de llamado de variantes

Los archivos VCFs se analizaron utilizando la plataforma de Franklin by Geenox. Esta plataforma se basa en la clasificación ACMG/AMP, que se construye con base a los estudios clínicos y experimentales de cada variante registrada a nivel mundial (Li, M., et al 2016).

Predicción bioinformática

Mediante los softwares Missense 3D-Data base, AlphaFold, PolyPeth-2 e UniProt fue posible visualizar la estructura las proteínas y verificar si las mutaciones exónicas identificadas en las muestras provocan algún cambio conformacional. Por otro lado, para las variantes intrónicas, se utilizó SpliceAI para predecir su impacto en el splicing del ARN, evaluando posibles alteraciones en los sitios consenso de empalme, la activación de sitios crípticos y la posible pérdida o ganancia de sitios de splicing.

Resultados

Caracterización de muestras clínicas de carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

Siguiendo el esquema de trabajo de la figura 5, después de la revisión de bloques con tejido FFPE diagnosticados con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), se realizó la caracterización biológica determinando la expresión de p16 y detección de VPH. Posterior a la evaluación de criterios calidad, en este estudio se seleccionaron 27 biopsias de pacientes atendidos dentro del Hospital de Oncología, Centro Médico Siglo XXI. Estas muestras cumplieron con los criterios de calidad adecuados y fueron secuenciadas de manera exitosa en el laboratorio de secuenciación de la coordinación de investigación en salud del mismo instituto. Las 27 muestras seleccionadas corresponden principalmente a los sitios de cavidad oral, laringe y orofaringe que a su vez se distribuyeron en los cuatro grupos de estudio, VPH+/p16+, VPH-/p16-, VPH+/p16-, VPH-/p16+, con una n= 7,7,7,6, respectivamente.

La genotipificación mediante Direct Flow CHIP identificó que las muestras positivas a VPH incluidas en este estudio fueron predominantemente de alto riesgo. VPH-16 predominó con una frecuencia del 48%, seguido del VPH-39 y VPH-56 con una frecuencia del 10% para ambos. El resto de los genotipos identificados tuvieron una frecuencia <10% (Figura 6A). Respecto al tipo de infección, mono o coinfección, fue variable entre los grupos. En específico el grupo discordante VPH+/p16- fue el grupo con mayor porcentaje de coinfección con un 42%, en comparación con el 28% correspondiente al grupo VPH+/p16+. Sin embargo, el grupo doble positivo presentó un 71% de muestras con monoinfección que en su totalidad fueron VPH-16 (Figura 6B). En cuanto a la expresión de p16, las muestras seleccionadas fueron aquellas que tenían un patrón de expresión >70%, color marrón intenso, en la zona tumoral como se observa en la figura 6C izquierdo. De las muestras p16 positivas, algunas presentaron patrones de expresión diferentes, por ejemplo, en la membrana plasmática o todo el citoplasma, sin embargo, no se identificó un patrón de p16 en los grupos.

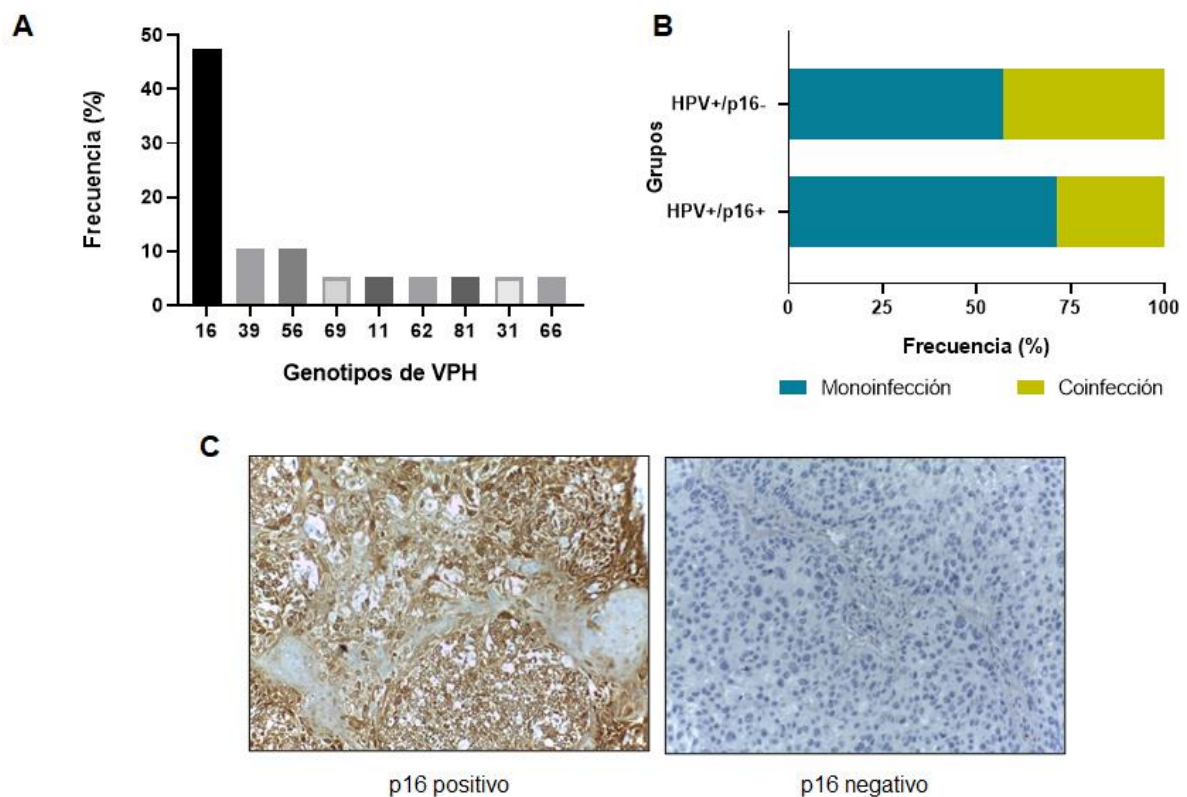


Figura 6. Caracterización de las 27 muestras de HNSCC seleccionadas. A) Genotipos de VPH identificados en los grupos positivos para el virus (%). **B)** Frecuencia de monoinfección o coinfección (%) en los grupos VPH positivos. El mayor tipo de infección en el grupo VPH+/p16+ fue monoinfección con genotipo 16 de VPH. **C)** Imagen representativa de las células epiteliales escamosas con expresión de p16 mediante inmunohistoquímica (IHQ). De lado izquierdo se muestra como p16+ con más del 70% de células expresando p16, de lado derecho una IHQ negativa con nula expresión de p16 en la zona tumoral. Microscopía óptica, aumento total 400x.

Secuenciación de panel dirigido en bloques FFPE de HNSCC.

La secuenciación se realizó con el *AmpliSeq Focus Panel For Illumina*. En la primera parte del proceso se evaluó la construcción de librerías mediante electroforesis automatizada de alta sensibilidad con el equipo TapeStation de Agilent en donde el tamaño del amplicon esperado fue de 300 pb. Las 27 muestras procesadas para generación de librería presentaron una banda definida y enriquecida en 300 pb como se muestra en la figura 7A. Otra forma de observar la librería construida es mediante un electroferograma (Figura 7B) en donde se observa un pico correspondiente a 300 pb. De esta forma se aseguró que todas librerías fueron construidas con éxito.

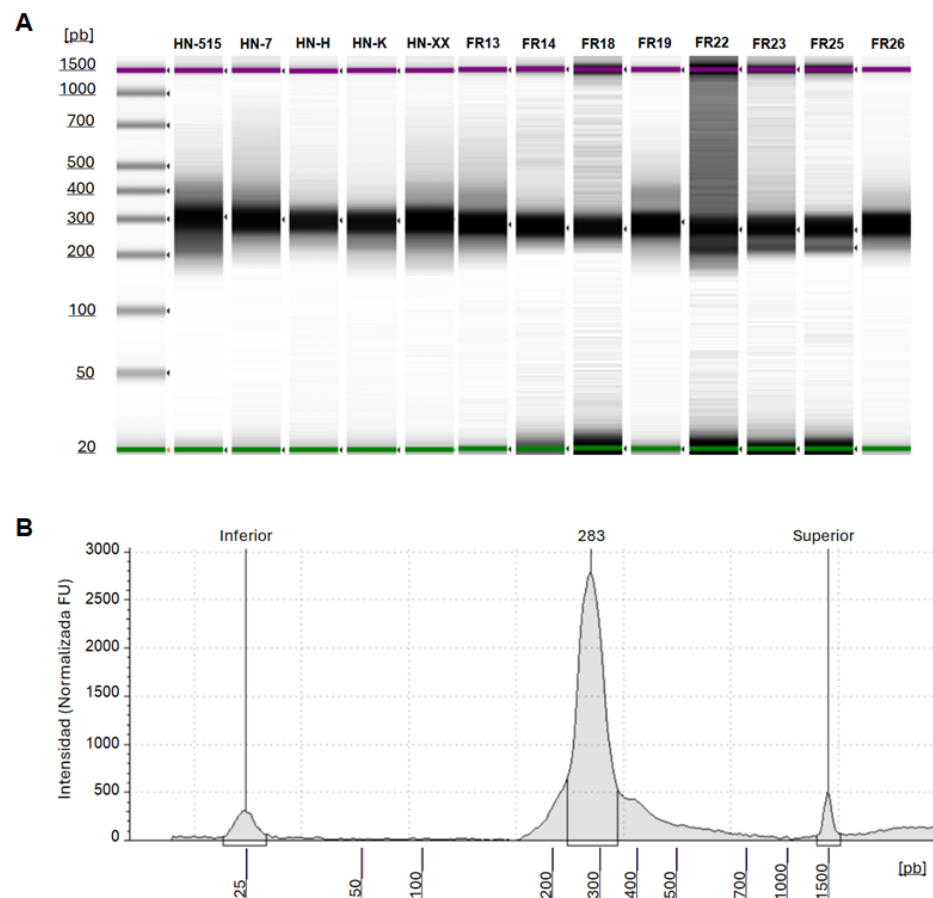


Figura 7. Análisis de construcción de librerías para secuenciación de próxima generación (NGS). **A)** Electroforesis automatizada de alta sensibilidad con TapeStation. Se cuantificaron 2 µl de la librería construida y se evaluó el tamaño de cada una de las librerías de las muestras, el tamaño del amplicon fue de 300 pb. En morado la banda del marcador superior, en verde el marcador inferior. **B)** Ejemplo de un electroferograma de una de las librerías construidas, se muestran tres picos que representan el marcador de tamaño inferior, superior y un pico con enriquecimiento en 300 pb, equivalente al amplicon indicado en Illumina Focus Panel.

Se utilizó el Q-score como parámetro para conocer la calidad y rendimiento de los datos generados. Al final de la secuenciación, todas las muestras pasaron los parámetros de profundidad mayor a 500x, y el 97.6% de los datos pasaron el valor de Q30 (Figura 8A). Como se observa en la figura 8B izquierdo, es un ejemplo de la calidad por secuencia base, el diagrama de caja muestra las estadísticas de puntuación de calidad agregada (puntuación Phred) en cada posición a lo largo de todas las lecturas del archivo. El comportamiento de la distribución de las lecturas en los cuartiles Q10, Q20 fue baja, manteniéndose principalmente en Q30 desde el inicio hasta el final de la secuenciación. En la figura 8B derecho, se observa un ejemplo de la calidad por secuencia en mosaico. Este gráfico permite observar las puntuaciones de calidad promedio de cada mosaico en todas sus bases para ver si hubo una pérdida de calidad asociada con solo una parte de la celda de flujo. El mosaico está representado desde colores fríos (azules) a cálidos (rojos) siendo los colores fríos las posiciones en las que la calidad estaba en la media o por encima para esa base, mientras que los colores cálidos indica que los pozos tenían peor calidad para esa

base. En este caso se observa una *flow cell* homogénea en color azul y no se presentan errores en rojo a lo largo de ella. Posteriormente, todas las muestras analizadas cumplieron con más del 80% de alineamiento *on target*.

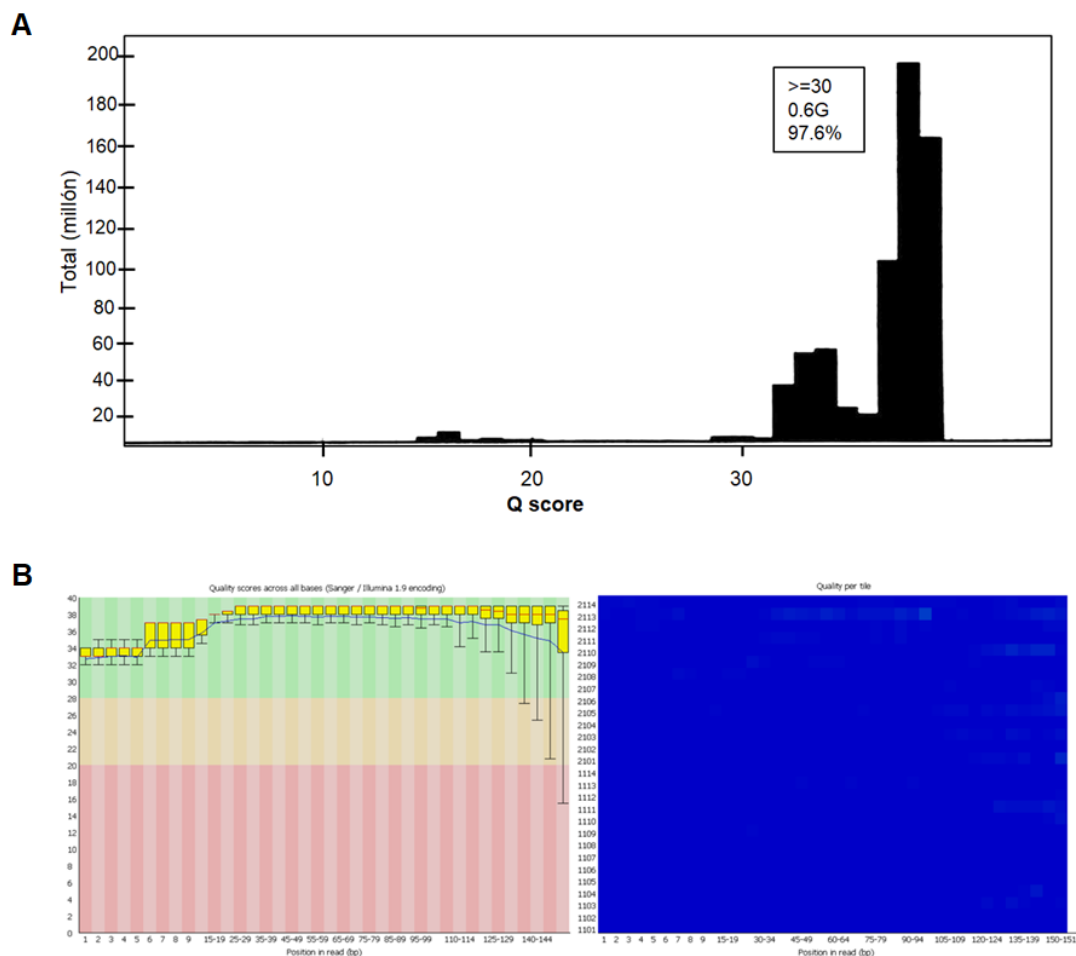


Figura 8. Evaluación de la calidad de secuenciación. A) Q-score global de secuenciación. El 97.6% de las lecturas por millón generadas se colocaron dentro del Q-score 30. Un porcentaje mínimo estuvo dentro del Q20 y ninguna lectura cayó en el Q10. **B)** Análisis de archivo FastQC. De lado izquierdo se muestra un ejemplo del Q-score de una muestra individual, las lecturas por millón se conservaron en Q30 de inicio a fin de la corrida. De lado derecho se muestra un mosaico representativo de la *flow cell*, en donde en color azul significa que no existieron errores dentro de la misma.

Análisis de variantes somáticas en muestras en FFPE de HNSCC.

Los archivos de llamado de variantes (VCFs) se analizaron en Franklin by Genoox. La clasificación de las variantes fue con base a la clasificación de variantes somáticas de la ACMG/AMP. Se identificaron un total de 858 variantes somáticas que incluyen variantes clasificadas según la AMP como Tier II,III,IV, en este estudio no se identificaron variantes Tier I y no se reportan las Tier IV.

Las variantes Tier II y III son posiblemente patogénicas y con significado incierto (VUS), respectivamente. Se identificaron 110 variantes en total de estas dos clasificaciones en todas las muestras, las variantes más predominantes fueron las VUS con un 87.3% como se observa en la figura 9A. Las variantes Tier II fueron las que se encontraron en un 22.2% en el grupo doble positivo, siendo el grupo con más variantes de este tipo, en comparación con el resto de los grupos. Particularmente, el grupo discordante VPH+/p16- es el grupo en el que únicamente se identificaron variantes Tier III. Mientras que para el grupo doble negativo y discordante VPH-/p16+ el 12% de las variantes identificadas fueron Tier II (Figura 9B).

Se identificaron un total de 27 genes mutados, entre ellos, los genes *DDR2* y *FGFR4* fueron los únicos genes que presentaron las mismas variantes en los cuatro grupos. Mientras que los genes *ERBB2*, *NF1*, *MTOR*, *RET*, *NRAS*, *CDK4*, *BRCA1* fueron genes identificados con variantes únicamente en el grupo doble positivo. En cuanto al grupo doble negativo se identificaron variantes en *KIT*, *HRAS*, *MYC*, sin embargo, las variantes en *ALK*, *MED12*, *BIRC2*, *BRAF*, *MYCN* fueron exclusivas de este grupo (Figura 9C).

Particularmente, las variantes identificadas en *PIK3CA* fueron constantes en los grupos VPH+/p16+, VPH-/p16- y VPH-/p16+. Mientras que, se identificaron variantes en *KIT* en todos los grupos menos en el VPH-/p16+ (Figura 9C).

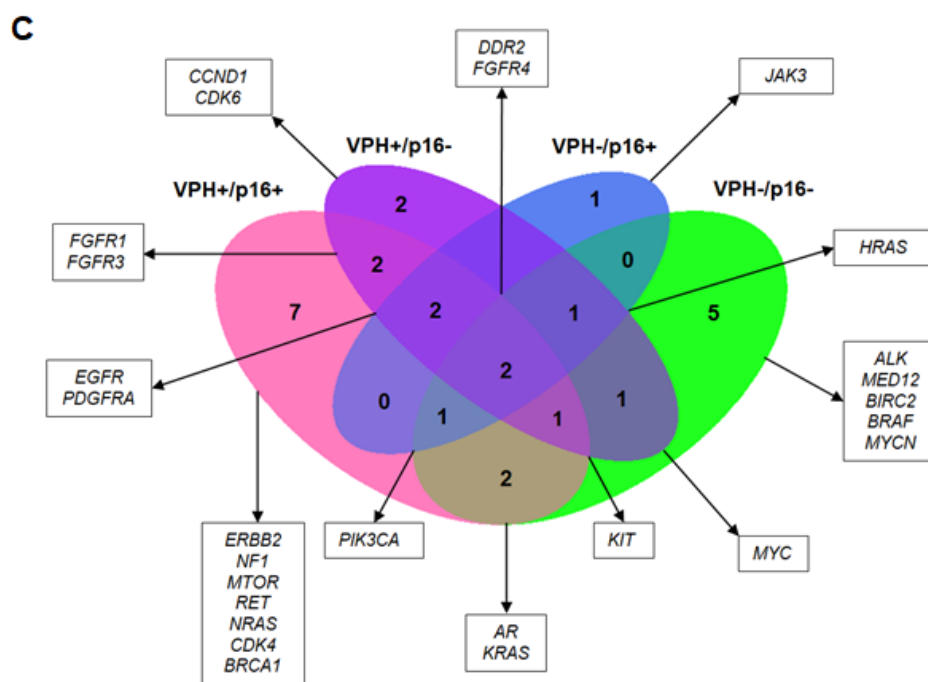
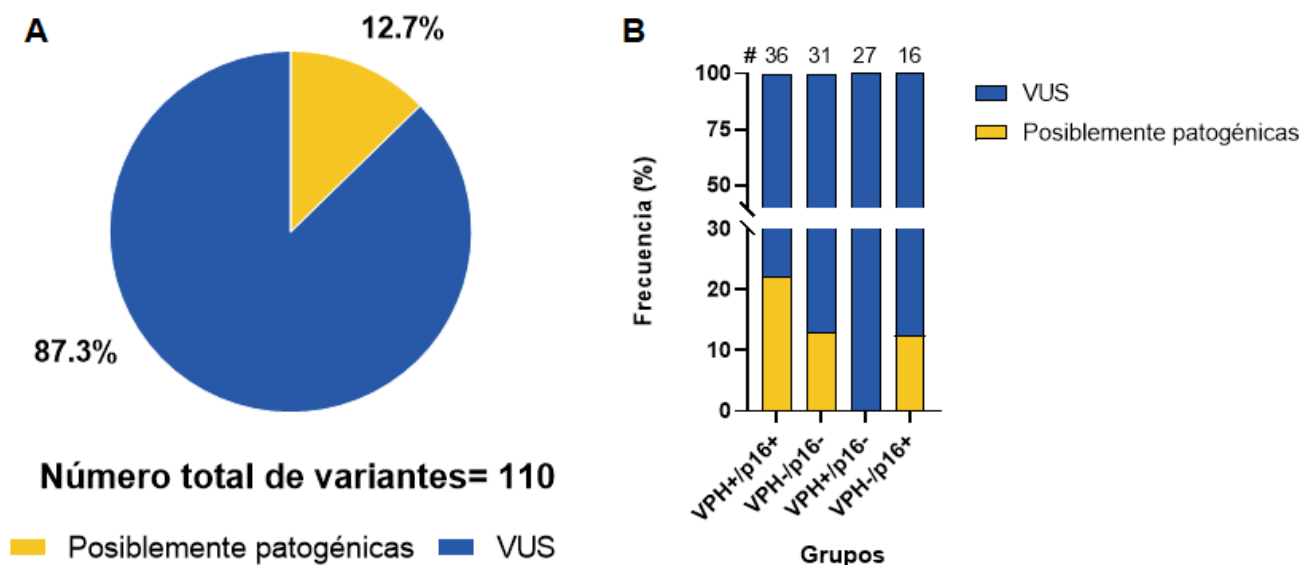


Figura 9. Distribución de las variantes somáticas en tumores HNSCC de pacientes mexicanos. **A)** Variantes somáticas totales en HNSCC según la clasificación de la ACMG (%), en donde según la AMP Tier I,II,III, IV corresponden a Patogénicas, Posiblemente patogénicas, Con significado incierto (VUS) y Benignas, respectivamente. Un total de 110 variantes entre Tier II y III fueron identificadas a lo largo de todos los grupos. >90% de las variantes fueron Tier IV (datos no mostrados). **B)** Distribución de las variantes somáticas en los grupos de estudio (%). El grupo VPH+/p16+ presento >20% de variantes Tier II, siendo el grupo con mayor porcentaje de estas variantes. Mientras que el discordante VPH+/p16- únicamente albergó variantes VUS. **C)** Diagrama de Venn con los 27 genes mutados. Se observan aquellos genes compartidos entre todos los grupos, *DDR2* y *FGFR4*. En los tumores VPH+/p16+ y VPH-/p16- se identificaron, al menos, 5 genes mutados que no se compartían con los demás grupos.

Frecuencia mutacional de los genes mutados en HNSCC de pacientes mexicanos.

Como se observa en el Oncoplot de la figura 10, las mutaciones patogénicas identificadas se encuentran en los genes *PIK3CA*, *KRAS*, *EGFR*, *PDGFRA*, *FGFR3*, *RET* y *NRAS*. Además, destaca la presencia de una considerable variabilidad de genes con mutaciones clasificadas como VUS, lo que abre nuevas oportunidades para futuras investigaciones.

En este gráfico, se puede notar que los genes *FGFR4* y *DDR2* están mutados en prácticamente el 100% de las muestras analizadas. Por otro lado, el gen *PIK3CA* muestra una tasa de mutación del 25.9% en el total de muestras, representando el 57.1% de las muestras VPH+/p16+. Aunque el número de muestras en esta categoría doble positiva es limitado, la prevalencia de mutaciones en este gen es significativa.

Asimismo, en *KIT* se identificó una frecuencia de mutación global del 22.2%, representando el 28.5% de los tumores VPH+/p16+, VPH-/p16- y VPH+/p16-.

De forma interesante, entre la familia de genes *KRAS*, *NRAS* y *HRAS*, este último, fue el más frecuentemente mutado con una tasa de mutación del 18.5% en el total de las muestras, con variantes predominantemente en el grupo VPH+/p16-.

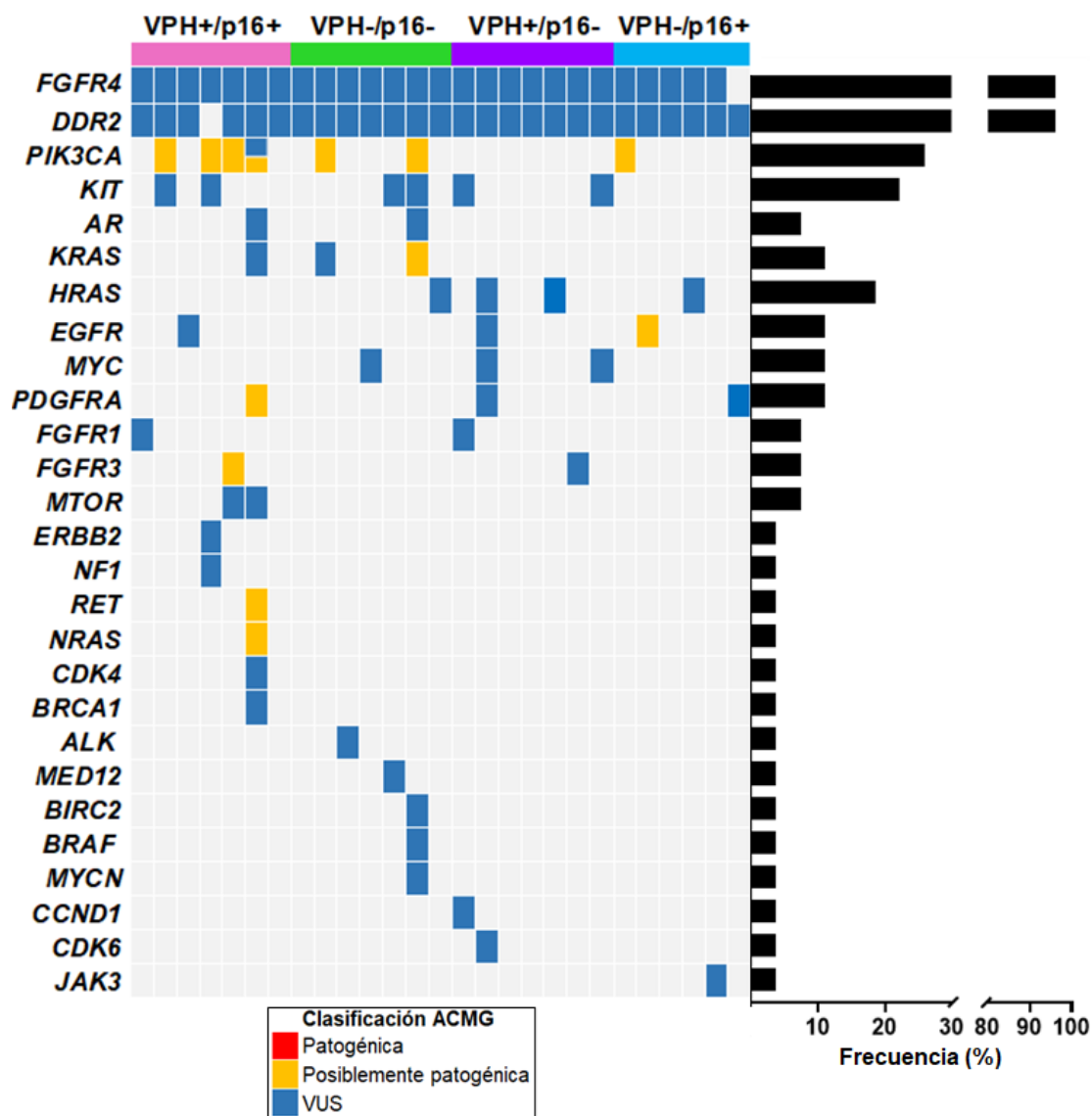


Figura 10. Perfil mutacional en genes de relevancia clínica y su frecuencia en las muestras con HNSCC de pacientes mexicanos. El oncoplot muestra las variantes clasificadas según la ACMG. En la parte superior en colores rosa, verde, morado y azul se observan las muestras agrupadas según su estatus de VPH y p16, a la izquierda los 27 genes mutados, al centro las variantes y a la derecha la frecuencia de mutación por gen. Se observa que *DDR2* y *FGFR4* son los que tienen mayor frecuencia, seguido de *PIK3CA*, *KIT* y *HRAS*.

Perfil mutacional de los HNSCC en pacientes mexicanos.

Los tumores del grupo positivo albergaron 36 variantes totales, entre ellas Tier II y III, por lo tanto, fue el grupo con mayor número de variantes identificadas en comparación con el resto de los grupos. Ocho de estas variantes fueron clasificadas como Tier II o posiblemente patogénicas.

En segundo lugar, se sumaron 32 variantes Tier II y III en el grupo VPH-/p16-. Particularmente, entre los tumores VPH+/p16+ y VPH-/p16- se registró una muestra en cada grupo que presentó un alto número de variantes, 14 y 11 respectivamente. La muestra con 14 variantes del grupo VPH+/p16+ presentó mutaciones en Tier II/ posiblemente patogénicas en *PIK3CA*, *PDGFRA*, *RET* y *NRAS*, mientras que la muestra con 11 variantes del grupo VPH-/p16- presentó mutaciones en *PIK3CA* y *KRAS* clasificadas como Tier II.

PIK3CA es el gen con mayor número de variantes Tier II, en específico, fueron variantes que se presentaron en los exones 2, 8 y 10 del gen. Las variantes identificadas en *HRAS* fueron principalmente en el exón 2, mientras que para *PDGFRA* únicamente se registraron variantes en el exón 18, sin embargo, para *MED12*, *BIRC2*,

BRAF, *MYCN*, *BRAF*, *CCND1*, *CDK6*, *CDK4* y *NF1* las variantes se presentaron en regiones no codificantes (Figura 11).

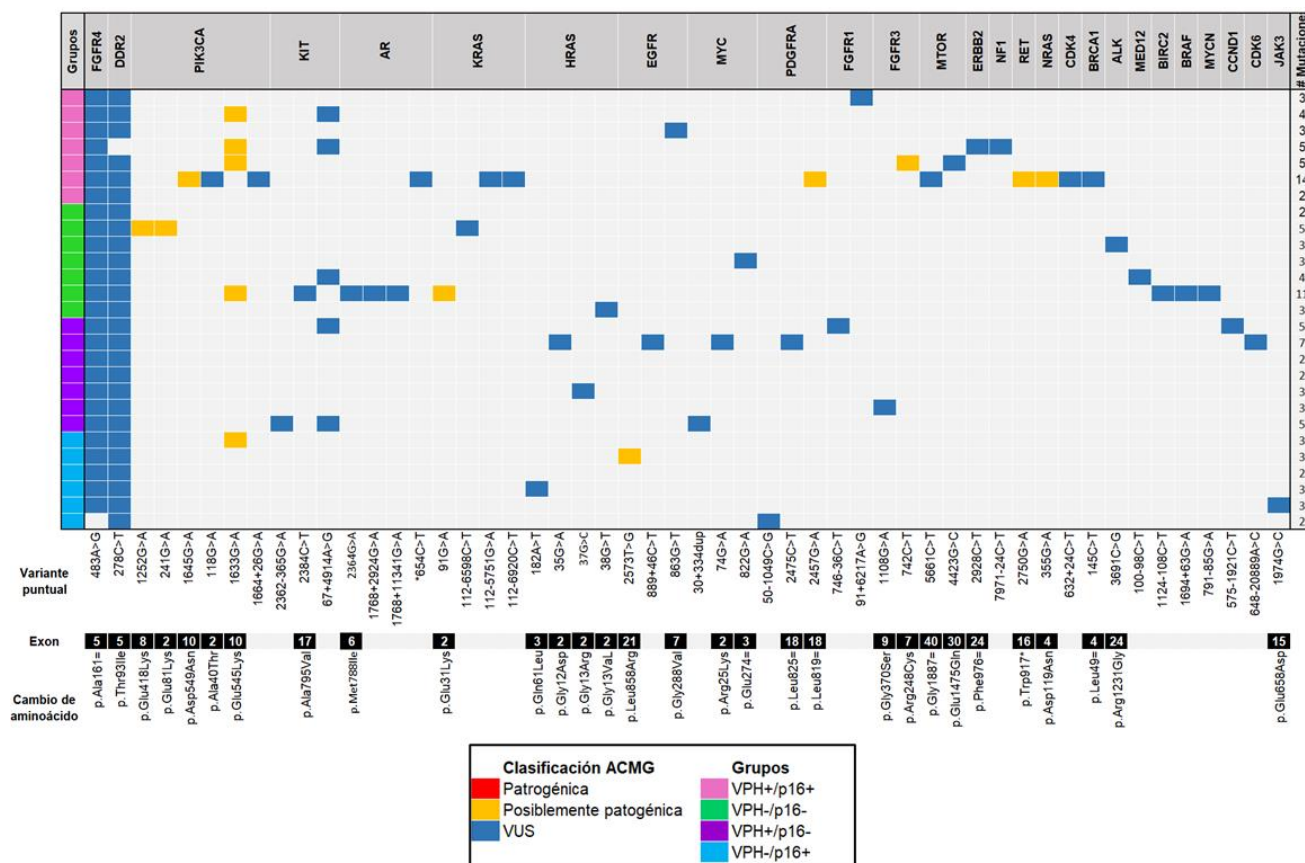


Figura 11. Perfil mutacional de los HNSCC en pacientes mexicanos. De izquierda a derecha se observan: los grupos de estudio, las variantes somáticas y el número de variantes totales por muestra. En la parte superior los genes, en la parte inferior el cambio nucleico puntual, seguido de la región exónica o intrónica, y finalmente el cambio a nivel proteico que implica esa variante. PIK3CA fue el gen con más número de variantes posiblemente patogénicas. Los principales grupos con variantes Tier II, fueron VPH+/p16+ y VPH-/p16-. Asimismo, en estos mismos grupos se reportó una muestra para cada uno con más de 10 variantes.

Características clínicas y mutaciones génicas en los HNSCC de pacientes mexicanos.

Como se observa en la figura 12 (panel superior), se relacionaron los datos clínicos de las muestras incluyendo antecedentes de consumo de tabaco y alcohol, sexo y sitio anatómico. La información clínica esta más enriquecida en el grupo doble positivo y doble negativo. De forma limitada se identificó que los tumores del grupo VPH+/p16- son principalmente de la cavidad oral, mientras que los del grupo VPH-/p16+ son en su mayoría de laringe. De forma general, el sexo predominante de los pacientes con HNSCC fue el masculino. Los tipos de mutaciones génicas identificadas se observan en la figura 12 (panel inferior), el 46.4% de las variantes fueron de cambio de sentido, el segundo lugar fue para las mutaciones silenciosas con el 29%, mientras que las mutaciones en regiones intrónicas correspondieron al 21.8%. Las variantes génicas que se presentaron en menor porcentaje fueron las de cambio en el marco de lectura, truncantes y en la región 3' UTR con el 0.9% cada una. En específico, una de las muestras pertenecientes al grupo VPH+/p16+ contuvo una amplia variedad de mutaciones, todas las descritas con anterioridad, a excepción de las de cambio en el marco de lectura.

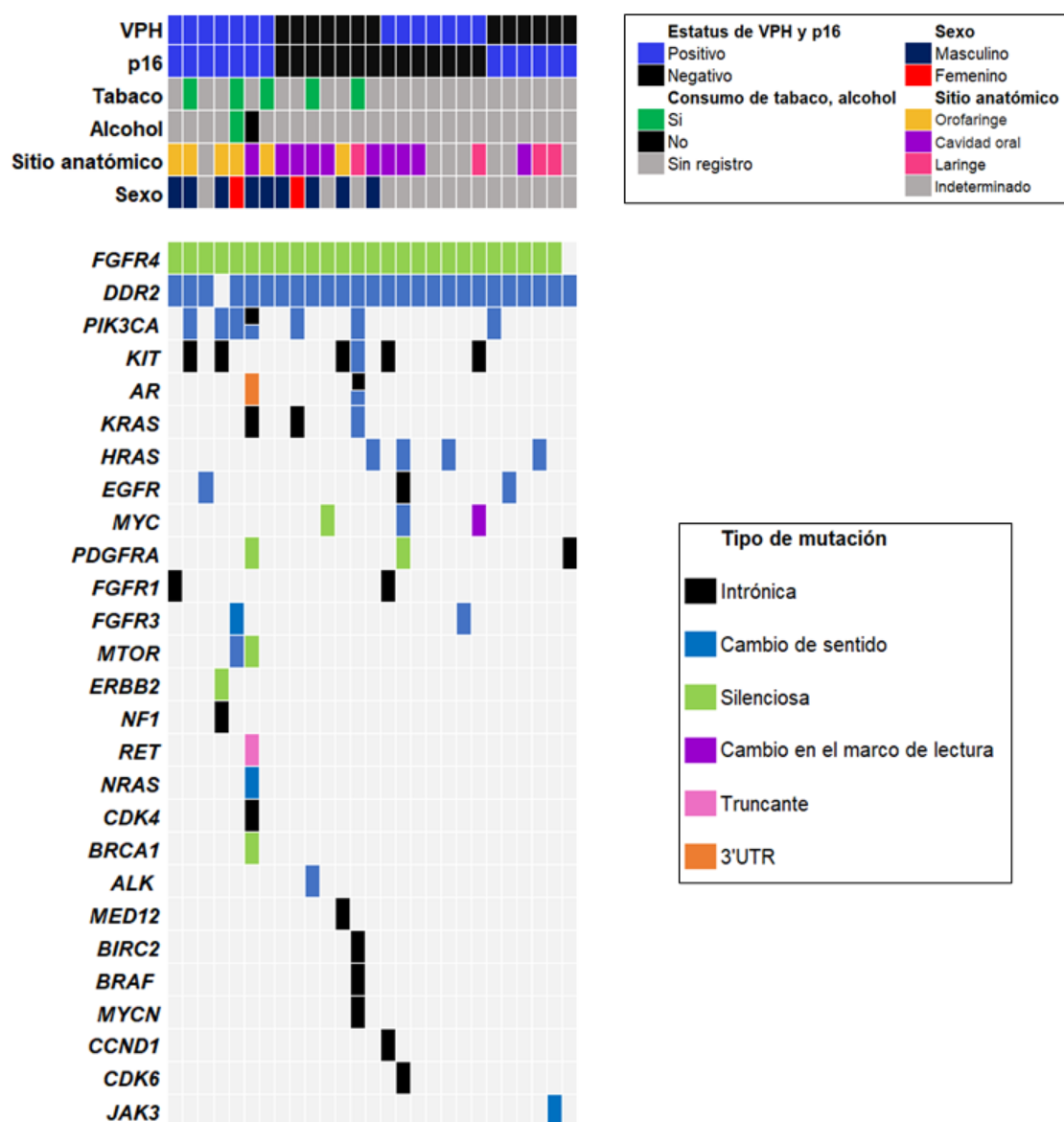


Figura 12. Características clínicas y tipo de mutación génica. En la parte superior del heatmap se encuentra la información clínica sobre los pacientes con HNSCC incluidos en este estudio, tales como antecedentes de consumo de tabaco y alcohol, sexo, y sitio anatómico. En la parte inferior el tipo de mutación: silenciosa, cambio de sentido, intrónica, cambio en el marco de lectura, región 3' UTR o truncante. Las principales variantes fueron silenciosas y cambio de sentido, en menor frecuencia las de la región 3' UTR y truncantes.

Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos en HNSCC de pacientes mexicanos.

Con el objetivo de indagar en los posibles procesos biológicos que se enriquecían considerando los 27 genes con mutaciones identificados en las muestras de tumores HNSCC, se hizo un análisis de KEGG en donde se observa que los principales procesos son relacionados con la regulación positiva de la actividad cinasa. Cabe destacar que, se hizo el análisis KEGG considerando los genes mutados de forma global sin hacer un análisis diferencial considerando la expresión de p16 o VPH ya que como se observa en la figura 9C, son pocos los genes identificados como únicos o exclusivos entre los grupos discordantes. Interesantemente, cerca de 22 genes están involucrados en la señalización intracelular (Figura 13A), como se observa en el gráfico el enriquecimiento es significativo considerando el valor estadístico FDR. Cabe resaltar que, en primer lugar con un FDR más significativo se encuentra el enriquecimiento en los receptores tirosina cinasa, este resultado es relevante ya que el únicamente el 25% de los genes del panel utilizado corresponden a estos receptores.

Adicionalmente, nuestros análisis identificaron genes que presentan variantes y que pueden interactuar entre sí. Estas aproximaciones bioinformáticas están basadas en datos *in silico* y experimentales, se ilustran en la figura 13B.

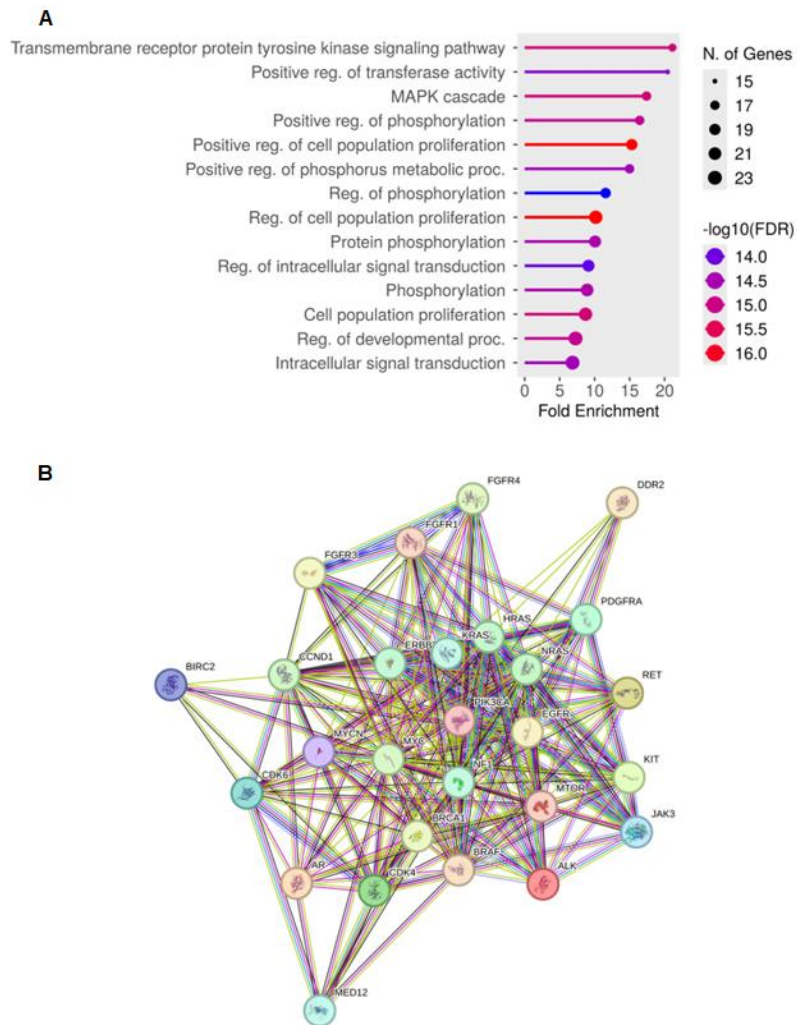


Figura 13. Análisis de enriquecimiento e interacción de los genes mutados. A) Análisis de Gene Ontology sobre procesos biológicos, el principal proceso en donde la mayoría de los genes mutados están involucrados es la señalización celular. **B)** Interacción proteína- proteína. Los nodos circulares de la red representan cada proteína unida mediante líneas. Las líneas azules turquesa y rosa intenso representan interacciones conocidas según bases de datos y modelos experimentales, las líneas verdes, rojas y azul intenso indican interacciones basadas en la cercanía génica, fusión

de genes y co-ocurrencia de genes, respectivamente; el color morado indica homología de proteínas.

Alteraciones estructurales y score de patogenicidad de las variantes

Con la finalidad de predecir el impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína, se analizaron las variantes de un solo nucleótido (SNV) con cambio de sentido que fueron detectadas en exones. Mediante el método de clasificación de la figura 14A, se compararon las puntuaciones de AlphaMissense dadas por Missense 3D database, PolyPhen- 2, AlphaFold y UniProt. El análisis de cambio conformacional indico que el 17.3% de las variantes con cambio de sentido presentaron cambios estructurales. Entre los genes que presentaron alteraciones estructurales fueron *HRAS*, *EGFR* y *FGFR3*, (Figura 14B), el cambio estructural común en estos genes fue expansión del volumen de la proteína. Sin embargo, en *EGFR* la variante p.Leu858Arg implicó cambios adicionales como sustitución de un residuo hidrófobo por un residuo hidrófilo. Por otro lado, la puntuación AlphaMissense predice el impacto funcional de estas mutaciones y el valor dado puede oscilar entre 0 y 1, un score cercano a cero indica una variante benigna mientras que scores mayores cercanos a 1 reflejan la mayor probabilidad de que la variante sea causante de una enfermedad. Las cuatro herramientas utilizadas para predicción tuvieron un alto nivel de concordancia en cuanto a la puntuación. De todas las variantes con cambio de sentido, que en su mayoría eran clasificadas como VUS por la ACMG/AMP, el 34.8% se posicionaron como benignas, el 17.3% quedaron con significado incierto y el 47.9% se posicionaron como patogénicas, según el valor AlphaMissense. Por ejemplo, en *FGFR3* se identificaron dos variantes diferentes en distintos exones, mediante el

análisis Missense 3D la primer variante p.Gly370Ser sí reflejó cambios estructurales, en contraste con la segunda variante p.Arg248Cys que no fue reportada con cambios estructurales (Figura 14B). Sin embargo, los valores de AlphaMissense fueron de ≈ 0.06 y ≈ 0.99 (Figura 14C), respectivamente. Estos datos son relevantes ya que se observa como una variante con implicaciones estructurales no necesariamente es patogénica o viceversa.

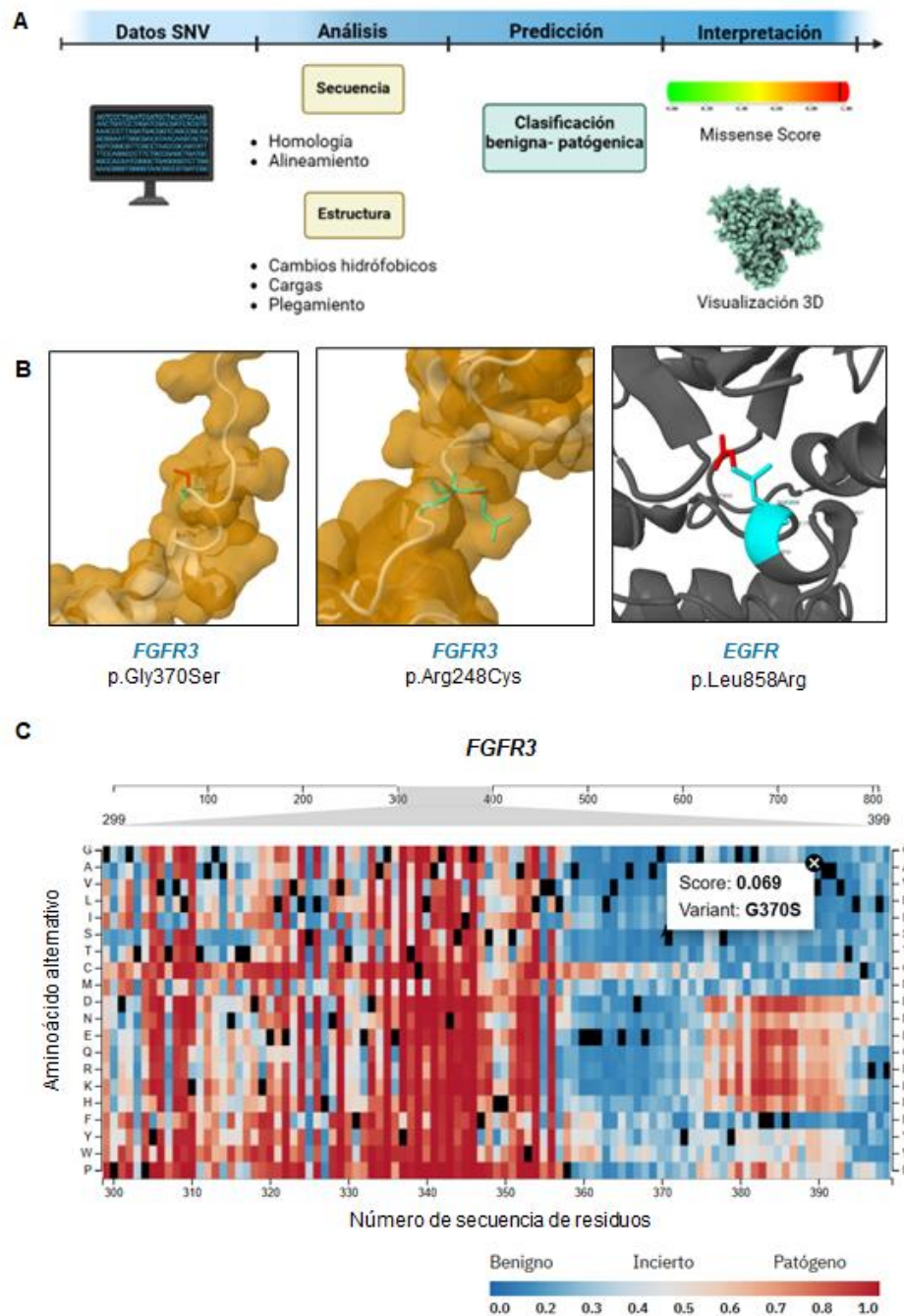


Figura 14. Predicción sobre patogenicidad y cambios estructurales de variantes.

A) Metodología global para el análisis de variantes con cambio de sentido. La predicción fue dada por softwares de acceso libre. **B)** Estructuras 3D de proteínas. El color rojo representa el cambio aminoacídico y en turquesa el aminoácido *wildtype*. **C)**

Heatmap con los posibles cambios de residuos aminoacídicos en *FGFR3* representados en color azul o rojo, según su score de patogenicidad. Las variantes en color azul son las benignas y en rojo aquellas patogénicas con un puntaje de AlphaScore cercano a 1.

Vías alteradas en pacientes mexicanos con HNSCC asociados a VPH.

Para comprender mejor la función de las alteraciones génicas identificadas, incluyendo todo tipo de variante, en los tumores de HNSCC se identificó que la mayoría de las muestras en los cuatro grupos de estudio tenían al menos una alteración genética perteneciente a la vía del receptor tirosina quinasa (RTK) RAS/ PI3K. Las variantes puntuales se muestran en la figura 11, entre ellas destacan 483 A >G en *FGFR4*, 1633 G>A en *PIK3CA*, 67+4914 A>G en *KIT*.

Como se observa en la figura 15, las cajas debajo de cada gen se observa el porcentaje de muestras por grupo que albergaron variantes de tipo Tier II y III. Las frecuencias de mutación por gen en cada grupo son distintas. Entre los RTKs, las alteraciones en *FGFR4* fueron las más frecuentes en los cuatro grupos, seguidas de las alteraciones en *EGFR* y *FGFR1*. De forma interesante, *EGFR1* representó el 14.2% de los tumores VPH+/p16+ y VPH+/p16-.

Adicionalmente, se observa que las variantes en *HRAS* para el grupo doble positivo representan el 0%, sin embargo, para el mismo grupo el 14.2% de las muestras albergaron variantes en el gen *NRAS*. Mientras que las muestras de los grupos discordantes no presentaron variantes en *KRAS* (Figura 15).

Curiosamente, las frecuencias de alteración de *PIK3CA* variaron mucho en los diferentes sitios anatómicos y grupos. Entre los componentes de la vía del ciclo celular, dominaron las alteraciones de *MYCN*. *CCND1* y *CDK6/4* fueron los dos oncogenes más frecuentemente alterados de esta vía (Figura 15).

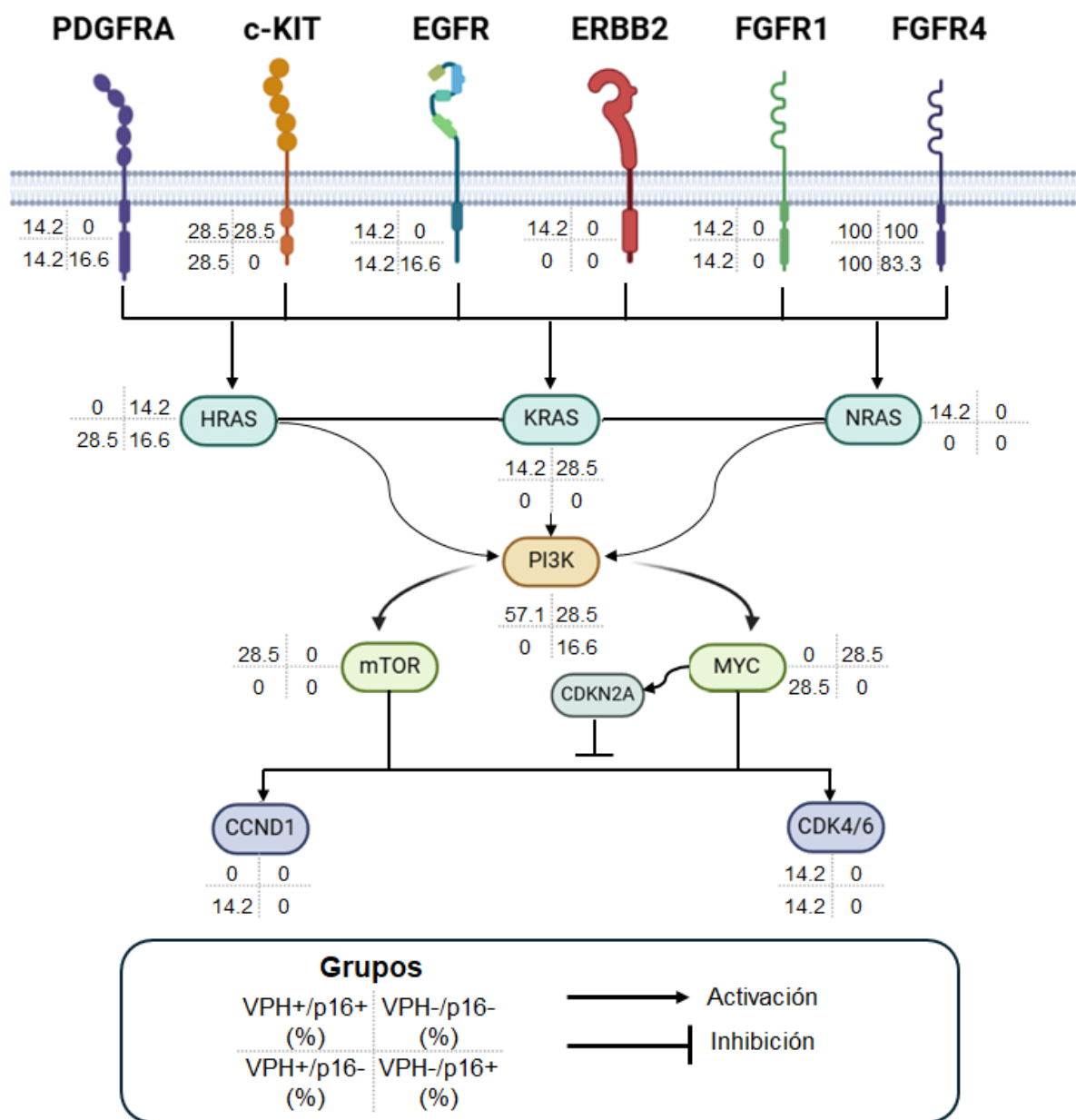


Figura 15. Principales vías de señalización con variantes somáticas en HNSCC.

Representación esquemática de la vía de señalización RTK/RAS/PI3K. Las alteraciones de la vía incluyen variantes de un solo nucleótido (SNV). Dentro de cada caja se indica el porcentaje de muestras que presentaron variantes en ese gen por cada grupo. Las vías o genes activados e inactivados se basan en los efectos previstos de las alteraciones y/o las funciones de las vías.

Evaluación del impacto de variantes intrónicas en el empalme del ARN

Con el objetivo de tener más información sobre el posible efecto de las variantes identificadas en regiones intrónicas, estas se evaluaron en SpliceAI. Esta herramienta predice si hay alteraciones en el empalme del ARN (*splicing*) con una puntuación entre 0-1, en donde el máximo valor es indicativo de una alta probabilidad de afectaciones en este proceso. El análisis indicó que el 82% de las variantes intrónicas obtuvieron un score de 0, el 14% se registraron con un score <0.05 y únicamente el 4% obtuvo una puntuación de 0.2. (Tabla 3). Si bien las variantes intrónicas identificadas en los HNSCC de pacientes mexicanos no representan un riesgo evidente en los sitios consenso de splicing, su posible impacto podría estar implicado en otros procesos regulatorios independientes del splicing. Entre ellos, la modulación de la expresión génica a través de elementos intrónicos reguladores, la alteración de la estabilidad y estructura del pre-ARNm, así como posibles efectos en la regulación postranscripcional.

Adicionalmente, con las variantes que obtuvieron un valor de SpliceAI distinto a 0, se comparó la frecuencia alélica en la base de datos gnomAD para indagar las diferencias entre distintas poblaciones. En la mayoría de las variantes se identificó que son variantes catalogadas como muy raras con una frecuencia alélica $<1\%$ en poblaciones

asiáticas, europeas, americanas y africanas. Sin embargo, según los datos de gnomAD la variante 50-1049C>G en *PDGFRA* tiene una frecuencia alélica de 8.4% en la población americana. Asimismo, GenomAsia reporta esta variante con una frecuencia alélica del 23% para la misma población.

Cabe mencionar que, debido a las diferencias en el origen ancestral y la estructura genética entre las poblaciones, es importante tomar con cautela los datos comparativos entre la población mexicana y otras. Las variaciones genéticas, la predisposición a enfermedades y las respuestas a factores ambientales pueden diferir significativamente entre grupos poblacionales, lo que limita la aplicabilidad directa de los datos de otras poblaciones a la mexicana. Por lo tanto, es esencial considerar las particularidades genéticas y los factores socioambientales específicos de cada población al interpretar estos datos.

Gen	Variante	Alteración de splicing (score)
<i>PIK3CA</i>	1664+26G>A	0
<i>KIT</i>	2362-365G>A	0
<i>KIT</i>	67+4914A>G	0
<i>AR</i>	1768+2924G>A	0
<i>AR</i>	1768+11341G>A	0
<i>AR</i>	*654C>T	0
<i>KRAS</i>	112-6598C>T	0
<i>KRAS</i>	112-5751G>A	0
<i>KRAS</i>	112-6920C>T	0
<i>EGFR</i>	889+46C>T	0.03
<i>MYC</i>	30+334dup	0
<i>PDGFRA</i>	50-1049C>G	0.2
<i>FGFR1</i>	746-36C>T	0
<i>FGFR1</i>	91+6217A>G	0.01
<i>NF1</i>	7971-24C>T	0.01
<i>CDK4</i>	632+24C>T	0
<i>MED12</i>	100-98C>T	0
<i>BIRC2</i>	1124-108C>T	0
<i>BRAF</i>	1694+63G>A	0
<i>MYCN</i>	791-85G>A	0
<i>CCND1</i>	575-1921C>T	0
<i>CDK6</i>	648-20889A>C	0

Tabla 3. Puntuación de SpliceAI en variantes intrónicas. Score de 0 a 1. Valor 0= nula probabilidad de afectaciones en el splicing proteico, 1= alta probabilidad de que la variante afecte el splicing.

Discusión

Este proyecto tuvo como objetivo principal describir el perfil mutacional de pacientes mexicanos con HNSCC, considerando el estatus de VPH y p16. Hasta ahora, existen muy pocos estudios que aborden esta información en nuestra población. Dado que el HNSCC es un tipo de cáncer asociado a una calidad de vida considerablemente reducida en los pacientes, el conocimiento y la caracterización de estos tumores se convierten en una prioridad para mejorar su diagnóstico y tratamiento.

Cabe destacar que la mayoría de los HNSCC son diagnosticados en etapas avanzadas, si bien, el marcador subrogado p16 y la de detección de VPH por PCR facilita la clasificación de los HNSCC en VPH+ y VPH-, existe un grupo de tumores que son discordantes y que poco se sabe sobre sus características moleculares.

En este estudio se caracterizaron 27 biopsias de HNSCC de pacientes del Hospital de Oncología CMN SXXI, distribuidas en cuatro grupos según VPH y p16. Encontramos que el genotipo más representativo en estos grupos fue VPH-16, seguido del VPH-39 y VPH-56, en el 2021 Méndez y colaboradores indicaron que además del VPH-16, el VPH-18 estaba entre los genotipos más comunes en las muestras HNSCC de pacientes mexicanos, sin embargo, bajo los criterios de selección considerados en este trabajo, las muestras con genotipo 18 no cumplían con el resto de los criterios para ser incluidas.

Adicionalmente, durante la caracterización biológica mediante IHQ y PCR encontramos que un 28% de muestras discrepaban entre VPH y p16, nuestros datos

son similares a los reportados por Hoffmann y colaboradores en el 2012 en donde el 20% de HNSCC de pacientes alemanes son discrepantes.

Respecto a los tumores discordantes VPH-/p16+, fue el grupo con menor número de muestras. En otros países latinoamericanos el número de casos HNSCC VPH-/p16+ originados en la cavidad oral son casi escasos, por ejemplo, en Perú de 68 tumores discordantes solo 10 son VPH-/p16+, mientras que en Colombia, Argentina y Brasil no se reportan casos de este grupo discordante para este sitio anatómico (Sichero, L., et al. 2022). Estas cifras remarcan el valor agregado que tienen los tumores discordantes secuenciados en este trabajo.

Mediante estrategias de secuenciación dirigida, se logró caracterizar de manera detallada los perfiles mutacionales de los grupos de estudio, obteniendo una profundidad de secuenciación superior a 500x, por muestra, así como más del 80% de alineamiento y cobertura, estos parámetros aseguraron la obtención de datos óptimos para el análisis. Identificamos un total de 858 variantes, estas las clasificamos en patogénicas (P), probablemente patogénicas (LP), variantes de significado incierto (VUS) y benignas (B). De tal forma que, en este trabajo reportamos aquellas con potencial accionable, sumando así un total de 110 variantes entre Tier II y III distribuidas en 27 genes.

Si bien, no se identificó un perfil mutacional en específico entre los grupos de estudio, en el grupo VPH+/p16+ destacan variantes en *ERBB2*, *RET*, *NRAS*, *BRCA1*, *NF1*, *MTOR* y *CDK4*, genes implicados principalmente en la señalización celular, proliferación y reparación del ADN. Por otro lado, para el grupo VPH-/p16- los genes

ALK, *BRAF*, *MYCN*, *MED12* y *BIRC2*, están implicados en la transcripción y resistencia a la apoptosis. Estos resultados podrían correlacionar con mejor pronóstico en los tumores dobles positivos, con un aumento en la supervivencia del 30% a 5 años (Gallegos, J., et al. 2010). Cabe destacar que los tumores discordantes VPH+/p16- albergaron variantes únicas en los genes *CCND1* y *CDK6*, por lo tanto, los HNSCC mexicanos asociados a VPH son comúnmente mutados en genes implicados en la proliferación celular.

Una de las posibles limitaciones por las que no se haya identificado un perfil mutacional bien definido es el número de muestras, los antecedentes de estudios moleculares sobre HNSCC incluyen más de 200 biopsias, sin embargo, este trabajo describe por primera vez el panorama mutacional de los HNSCC en México. Además, evaluamos el posible impacto de las mutaciones a nivel estructural y funcional de las proteínas, así como en regiones no codificantes de genes con relevancia clínica, proporcionando información para comprender las bases moleculares y el potencial impacto clínico de estas alteraciones.

Las variantes identificadas con mayor potencial accionable fueron Tier II, entre los genes con mayor número de variantes de este tipo es *PIK3CA*. En particular, las variantes Tier II en *PIK3CA* se identificaron en mayor proporción en el grupo VPH+/p16+. Es interesante notar que *PIK3CA* también está comúnmente mutado en el cáncer de endometrio y en algunos cánceres de ovario, lo que podría convertirlo en un sello distintivo de los cánceres ginecológicos, así como de los cánceres impulsados por el VPH (Markowska, A., et al. 2014).

La frecuencia global de mutación *PIK3CA* fue de 25.9%, en comparativa con otras poblaciones, en Asia se ha reportaron una frecuencia de mutación de 23.1% para *PIK3CA* en tumores HNSCC VPH positivos, frente al 9,5% en VPH negativos, cifras similares a estudios moleculares en cáncer de endometrio y ovario (Fernández, J., et al. 2020; Seiwert, T., et al. 2015).

El 73% de las mutaciones en *PIK3CA* se localizan comúnmente en 3 puntos calientes (E542K, E545K y H1047R/L) (Lui, V., et al. 2013), en el grupo doble positivo se identificaron >2 mutaciones de la variante E545K, sin embargo, en los demás grupos a excepción del discordante VPH+/p16- se identificó la misma variante en menor proporción. Al identificar variantes previamente descritas se puede destacar la precisión del uso del panel dirigido utilizado en este trabajo. La mutación p.Glu545Lys ha sido reportado en la base de datos COSMIC con una frecuencia del 11% en cánceres del tracto aerodigestivo superior.

La mayoría de los genes y vías analizados estaban relativamente alterados en una frecuencia más baja; sin embargo, las vías de señalización de PIK3CA/AKT/mTOR tuvieron una mayor frecuencia de mutaciones. Esta vía de señalización regula procesos celulares normales, como la proliferación celular, la supervivencia y la apoptosis. Estudios funcionales demostraron que PI3K portadora de cualquiera de las tres mutaciones del punto caliente es capaz de inducir la transformación en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, y que la actividad transformadora del mutante se correlaciona con una mayor actividad de la quinasa lipídica y la activación de la vía de señalización Akt (Kang, S., et al. 2005). Análisis mutacionales para este mismo gen

pero en HNSCC sin estatus de VPH ni p16 conocido, reveló que la mutación p.Glu545Lys estuvo presente en aquellos tumores provenientes de la hipofaringe, nuestro estudio reporta esta mutación en tumores orofaríngeos, sin embargo, no es posible hacer una asociación de la mutación respecto al sitio anatómico por el número de muestras en este estudio y por la falta de datos clínicos (Qiu, W., et al. 2006). Adicionalmente, la presencia de esta mutación se ha relacionado con quimiorresistencia a Vemurafenib, según datos de COSMIC. En China, los pacientes con HNSCC y mutaciones en *PIK3CA* se beneficiaron más de la quimioterapia con cisplatino en comparación con aquellos con *PIK3CA wildtype* (Song, B., et al. 2015). De esta forma, se correlaciona la mejor respuesta de los tumores HNSCC VPH positivos a la terapia unimodal y menos citotóxica.

Por lo tanto, este trabajo demuestra que los pacientes HNSCC del hospital de Oncología albergan mutaciones en *PIK3CA* fuertemente relacionadas a la presencia de VPH. Este mismo comportamiento se observó en otros estudios que incluyen muestras de cáncer de vulva, relacionando así la mutación p.Glu545Lys con VPH (Nichols, A., et al. 2013; Choschzick, M., et al. 2023). Sin embargo, Feldman, R., et al. 2016, reportó que de 735 muestras de HNSCC las mutaciones en *PIK3CA* son un evento frecuente, independiente del estado de VPH.

Por otro lado, en *KRAS* se identificaron variantes Tier II. Usualmente los perfiles de mutación de *KRAS* difieren significativamente entre cánceres, pero predominan en adenocarcinoma ductal de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeña y cáncer colorrectal. Las mutaciones en *KRAS* son en su mayoría SNVs, el 98% de las

cuales se encuentran en el codón 12 (G12), el codón 13 (G13) o el codón 61 (Q61) (Wood, K., et al. 2016). Se identificaron variantes en *KRAS* en todos los grupos, sin embargo, en el grupo VPH+/p16+ y VPH+/p16- se identificaron en mayor frecuencia en una relación 2:1. La variante p.Glu31Lys fue la única mutación identificada en la región codificante, el resto fueron variantes intrónicas. Mientras que en *HRAS* se identificaron las variantes p.Gly12Asp y p. Gly13Arg, consideradas dentro de los puntos calientes del gen.

El consumo de tabaco influye en la carga mutacional de *KRAS*. Se ha descrito una incidencia de mutaciones en *KRAS* de entre el 25 y el 35% en los fumadores y el 5% en los no fumadores. Por ejemplo, *KRAS* (G12C) se encuentra generalmente en pacientes con alto consumo de tabaco, mientras que *KRAS* (G12D) se identifica más comúnmente en tumores de pacientes no fumadores (Dearden, S., et al. 2013; Dogan, S., et al. 2012). Hacer una relación entre los datos clínicos de los HNSCC mexicanos y las variantes identificadas resultó complicado ya que únicamente se cuenta con datos de consumo de tabaco para dos pacientes, uno del grupo VPH+/p16+ y otro VPH-/p16-. Cabe mencionar que estos mismos pacientes tuvieron variantes intrónicas en *KRAS*, por lo tanto, es desconocido saber si las variantes exónicas en *KRAS* o *HRAS*, consideradas dentro de puntos calientes, tiene una asociación con el tabaquismo en los pacientes mexicanos.

A pesar de que las variantes en *KRAS* fueron Tier II, en un modelo de cáncer de pulmón se reportó que los pacientes que albergan mutaciones en *ALK* o *EGFR/KRAS*

responden mal al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (Schmid, S., et al. 2017).

De forma interesante, las mutaciones en *EGFR*, específicamente p.Leu858Arg en el exón 21, representa el 85-90% de todas las mutaciones conocidas en este gen para cáncer de pulmón (Sigismund, S., et al. 2018). Nosotros identificamos esta misma variante clasificada como posiblemente patogénica o Tier II en el grupo VPH-/p16+, sin embargo, otros estudios reportan que el receptor esta comúnmente sobre expresado en el 80–90 % de los tumores HNSCC VPH-, esto se ha relacionado con una supervivencia general precaria y sin progresión, ya que aumenta la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis, particularmente en cáncer de mama y pulmón (Bethune, G., et al. 2010).

En cáncer de pulmón, la mayoría de las mutaciones activadoras de quinasas inducen una conformación activa de la enzima que es independiente de la dimerización inducida por el ligando, estas mutaciones pueden ser las delecciones del exón 19, las inserciones del exón 20 y el mutante dual L858R/T790M, sin embargo, la variante L858R depende de la dimerización (Cho, J., et al. 2013). Incluso, se ha visto que algunas mutaciones pueden aparecer en respuesta al tratamiento de primera línea como cisplatino, en este sentido, se han diseñado fármacos para luchar con la resistencia adquirida, entre ellos Erlotinib, Gefitinib Afatinib, Dacomitinib y Osimertinib, este último diseñado de forma específica contra las mutaciones L858R/T790M en *EGFR* (Eberlein, C., 2015). Sin embargo, se ha reportado que aproximadamente el 40% de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) han desarrollado

inevitablemente una triple mutación, lo que promueve una pérdida de la actividad inhibitoria de los fármacos (Zhao, J., et al. 2018).

Los mecanismos de resistencia en EGFR no se han descrito detalladamente en HNSCC, dado que se encontró únicamente la mutación p.Leu858Arg en un grupo, se puede asociar el mal pronóstico de estos pacientes con los posibles mecanismos de resistencia descritos en otros tipos de cáncer. Algunos estudios reportan que las mutaciones en *EGFR* y *KRAS* son mutuamente excluyentes (Zheng, S., et al. 2021), curiosamente, únicamente una muestra del grupo VPH+/p16- tenía variantes VUS en ambos genes, una de ellas en una región exónica y otra en un intrón, respectivamente.

Dentro del 87.3% de las variantes VUS reportadas en este trabajo, los genes *FGFR4* y *DDR2* son los principalmente mutados ya que se identificaron variantes en estos genes en todos los grupos. Sin embargo, las mutaciones son silenciosas y de cambio de sentido, respectivamente. En COSMIC, únicamente existe reporte sobre la variante p.Thr93Ile en *DDR2*, este es considerado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con código rs2102133335.

Dado que este sistema de clasificación de la ACMG fusiona datos funcionales y clínicos en un sistema unidimensional, no siempre es evidente en qué criterios se ha basado una clasificación. Esto puede generar conflicto cuando se clasifican variantes VUS, a menudo denominada variante Tier III. En muchos casos, las variantes somáticas VUS son de significado desconocido debido a la insuficiencia de pruebas para clasificarlo, es decir, a la falta de información relevante, por lo que debe tratarse como tal. Con el fin de indagar más sobre cuales podrían ser los posibles efectos por

los que las variantes VUS identificadas son clasificadas de esta forma, se revisaron las estructuras 3D de las proteínas con variantes exónicas. La mayoría de las variantes con cambio de sentido no presentaron alteraciones en su estructura, sin embargo, el AlphaMissense predijo que, de todas las variantes con cambio de sentido, en su mayoría VUS, el 47.9% son patogénicas, con un score cercano a 1; lo que implica un daño en la funcionalidad de la proteína sin que este se vea reflejado en la estructura tridimensional.

En el análisis de las estructuras 3D se presentaron varios escenarios, por ejemplo, la variante p.Glu545Lys en *PIK3CA*, clasificada como posiblemente patogénica o Tier II, sí sufría un cambio conformacional relevante, este consistió en la sustitución de un aminoácido hidrófobo por un hidrófilo, representando una diferencia en las cargas de estos aminoácidos afectando la cavidad de la proteína. En este caso la clasificación de la variante junto con los cambios estructurales si hacen correlación.

Sin embargo, en otros casos como la variante p.Gly12Asp en *HRAS* clasificada como Tier III o VUS, según su categorización indica que es incierto el impacto clínico, sin embargo, la base de datos Missense DataBase predice que la sustitución de estos aminoácidos podría afectar la cavidad de la proteína, esto significa que los espacios dentro de la proteína mutada podrían alterar las funciones biológicas principalmente en sitios de unión y accesibilidad. Estos cambios estructurales han sido evaluados mediante otros análisis computacionales y se ha reportado que la mutación p.Gly12Asp desencadena cambios conformacionales que resultan en la activación constitutiva de la proteína Hras (Vatansever, S., et al. 2019). Por lo tanto, con estos

análisis se recalca la importancia de hacer validaciones para conocer el verdadero impacto de aquellas variantes VUS, ya que posiblemente únicamente sean categorizadas de esta forma por la falta de información experimental.

Para tener un panorama más amplio sobre todas las variantes identificadas en este trabajo, quisimos indagar sobre el efecto de las variantes intrónicas en el splicing del ARN, si bien este no es el único proceso que podría verse afectado por variantes intrónicas, es de los más comunes y accesibles de evaluar mediante técnicas bioinformáticas.

Los resultados de la evaluación de las variantes intrónicas identificadas predicen que no hay un efecto en el empalme de las proteínas, sin embargo, es importante profundizar en los demás efectos de este tipo de variantes ya que los intrones representan el 42% del genoma humano y contienen códigos de empalme esenciales que controlan la fidelidad del empalme previo al ARNm (Alexander, R., et al. 2010). Las mutaciones de empalme incorrecto en genes supresores de tumores (TSG) introducen con frecuencia codones de terminación prematura en transcripciones empalmadas anormalmente y provocan la degradación del ARNm, estas anomalías comúnmente se relacionan con enfermedades heredables (López, N., et al. 2005).

Conclusiones

En este trabajo caracterizamos tumores primarios de HNSCC en función del estatus de VPH y expresión de p16. El 40% de las biopsias disponibles fueron dobles positivas, el 32% resultaron dobles negativas, el 8% fueron VPH+/p16- y el 20% se clasificaron como VPH-/p16+.

Mediante secuenciación de nueva generación (NGS) se logró descubrir por primera vez el perfil mutacional de 27 muestras FFPE de HNSCC de pacientes mexicanos distribuidas en los grupos dependiendo su asociación con VPH y p16.

Con base a la literatura, se planteaba que los tumores VPH negativos presentaran mayor número de variantes en comparación con los tumores VPH positivos. Sin embargo, en este trabajo se identificó lo contrario con una diferencia mínima. Es posible que el número de muestras evaluadas haya influido en las cifras finales.

Centramos el interés de este trabajo en las variantes categorizadas como posiblemente patogénicas y de significado incierto (VUS), con un porcentaje de 12.7% y 87.3%, respectivamente. Las variantes VUS son consideradas así por la falta de evidencia sobre su patogenicidad, por lo tanto, es necesario fortalecer las futuras investigaciones para reducir el número de variantes clasificadas así. Sin embargo, planteamos una posible re-clasificación de estas variantes de acuerdo con su patogenicidad funcional y/ estructural.

En los tumores VPH+/p16+ un 22% de las variantes son posiblemente patogénicas, los dos grupos de tumores negativos a VPH presentaron el 13% y los tumores VPH+/p16- no tuvieron variantes de este tipo.

Entre las principales variantes posiblemente patogénicas con potencial accionable Tier II se encuentran en genes de la vía PIK3CA/Akt/mTOR, receptores RTK. Asimismo, fueron variantes que previamente ya han sido descritas en perfiles mutacionales de HNSCC y otros tipos de cáncer a nivel global, particularmente asociados a VPH. Lo que indica que podrían ser variantes distintivas de tumores impulsados por la infección de este virus.

Respecto a los HNSCC discordantes, este es el primer trabajo que identifica las variantes somáticas en estos tumores mexicanos. Debido al número reducido de biopsias para estos grupos no se identificó un perfil mutacional bien definido. Sin embargo, los HNSCC VPH+/p16- tiene mutaciones en genes implicados en la proliferación celular, similar a los tumores dobles positivos. Mientras que, los tumores VPH-/p16+ presentan variantes en *HRAS*, *EGFR*, *PDGFRA* y *JAK3*.

Por otro lado, en este trabajo se reportaron por primera vez variantes en regiones intrónicas en tumores HNSCC de pacientes mexicanos. Las variantes intrónicas no representaron un nivel de patogenicidad en sitios de empalme canónicos (splicing) de ARN, sin embargo, es necesario evaluar el impacto de estas variantes en otros procesos.

Los HNSCC son altamente heterogéneos, por lo tanto, los estudios moleculares como este permiten identificar alteraciones específicas de cada tumor, con el objetivo de desarrollar terapias dirigidas efectivas, tal como ocurre en otros cánceres más estudiados como es el caso de cáncer de mama.

Referencias

- Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., Rocco, J. W., Teknos, T. N., Kumar, B., Wangsa, D., He, D., Ried, T., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, 24(2), 185-199. <https://doi.org/10.1101/gr.164806.113>
- Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., & Gerstein, M. B. (2010). Annotating non-coding regions of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 559-571. <https://doi.org/10.1038/nrg2814>
- Alsbeih, G., Alharbi, N., Judia, S., Al-Qahtani, W., Khoja, H., El-Sebaie, M., & Tulbah, A. (2019). Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infection and the Association with Survival in Saudi Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 11, 820. <https://doi.org/10.3390/cancers11060820>
- Bao, Y., Gabrielpillai, J., Dietrich, J., Zarbl, R., Strieth, S., Schröck, F., & Dietrich, D. (2021). Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01212-4>
- Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N., & Xu, Z. (2010). Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: An overview and update. *Journal of Thoracic Disease*, 2(1), 48-51.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Yousoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine*, 354(6), 567-578. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053422>
- Boora, G. S., Chauhan, A., Kaur, R., Kaur, H., Chandel, J., Bhat, S. A., Ghoshal, S., & Pal, A. (2022). Genomic instability detected from the saliva of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma patients: Association with clinical implications. *Archives of Oral Biology*, 137, 105395. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105395>
- Chaturvedi, A., Engels, E., Pfeiffer, R., Hernandez, B., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M., Sibug Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C., Wentzensen, N., Altekruse, S., Anderson, W., Rosenberg, P., & Gillison, M. (2011). Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29, 4294-4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
- Cho, J., Chen, L., Sangji, N., Okabe, T., Yonesaka, K., Francis, J. M., Flavin, R. J., Johnson, W., Kwon, J., Yu, S., Greulich, H., Johnson, B. E., Eck, M. J., Jänne, P. A., Wong, K.-K., & Meyerson, M. (2013). Cetuximab response of lung cancer-derived EGF

receptor mutants is associated with asymmetric dimerization. *Cancer Research*, 73(22), 6770-6779. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1145>

Choschzick, M., Stergiou, C., Gut, A., Zoche, M., Ross, J., & Moch, H. (2023). *NOTCH1* and *PIK3CA* mutation are related to HPV-associated vulvar squamous cell carcinoma. *Pathology - Research and Practice*, 251, 154877. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154877>

Dearden, S., Stevens, J., Wu, Y.-L., & Blowers, D. (2013). Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: Meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Annals of Oncology*, 24(9), 2371-2376. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt205>

Dogan, S., Shen, R., Ang, D. C., Johnson, M. L., D'Angelo, S. P., Paik, P. K., Brzostowski, E. B., Riely, G. J., Kris, M. G., Zakowski, M. F., & Ladanyi, M. (2012). Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-related KRAS-mutant Cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(22), 6169-6177. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3265>

Eberlein, C. A., Stetson, D., Markovets, A. A., Al-Kadhimi, K. J., Lai, Z., Fisher, P. R., Meador, C. B., Spitzler, P., Ichihara, E., Ross, S. J., Ahdesmaki, M. J., Ahmed, A., Ratcliffe, L. E., O'Brien, E. L. C., Barnes, C. H., Brown, H., Smith, P. D., Dry, J. R., Beran, G., ... Cross, D. A. E. (2015). Acquired Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor AZD9291 Is Associated with Increased Dependence on RAS Signaling in Preclinical Models. *Cancer Research*, 75(12), 2489-2500. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3167>

Feldman, R., Gatalica, Z., Knezetic, J., Reddy, S., Nathan, C.-A., Javadi, N., & Teknos, T. (2016). Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 38(S1), E1625-E1638. <https://doi.org/10.1002/hed.24290>

Fernández-Mateos, J., Pérez-García, J., Seijas-Tamayo, R., Mesía, R., Rubió-Casadevall, J., García-Girón, C., Iglesias, L., Carral Maseda, A., Adansa Klain, J. C., Taberna, M., Vazquez, S., Gómez, M. A., del Barco, E., Ocana, A., González-Sarmiento, R., & Cruz-Hernández, J. J. (2020). Oncogenic driver mutations predict outcome in a cohort of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients within a clinical trial. *Scientific Reports*, 10(1), 16634. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72927-2>

Ferreira, J. A., Peixoto, A., Neves, M., Gaitero, C., Reis, C. A., Assaraf, Y. G., & Santos, L. L. (2016). Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resistance Updates*, 24, 34-54. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.003>

Gallegos-Hernández, J. F., Flores-de la Torre, C., & Hernández-Hernández, D. M. (2010). Valor del VPH como indicador de pronóstico en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 9(4), 149-155.

Giraldi, L., Collatuzzo, G., Hashim, D., Franceschi, S., Herrero, R., Chen, C., Schwartz, S. M., Smith, E., Kelsey, K., McClean, M., Gillison, M., Boccia, S., Hashibe, M., Amy Lee, Y.-C., & Boffetta, P. (2021). Infection with Human Papilloma Virus (HPV) and risk of subsites within the oral cancer. *Cancer Epidemiology*, 75, 102020. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2021.102020>

Guzmán-Arocho, Y. D., & Nishino, M. (2022). The discordant biomarker dilemma: What are the diagnostic implications of oropharyngeal squamous cell carcinomas with discrepant p16 and HPV results? *Cancer Cytopathology*, 130(11), 844-848. <https://doi.org/10.1002/cncy.22616>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Maso, L. D., Daudt, A. W., Fabianova, E., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., ... Boffetta, P. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777-789.

Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., ... Boffetta, P. (2009). Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(2), 541-550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>

Hoffmann, M., Tribius, S., Quabius, E. S., Henry, H., Pfannenschmidt, S., Burkhardt, C., Görögh, T., Halec, G., Hoffmann, A. S., Kahn, T., Röcken, C., Haag, J., Waterboer, T., & Schmitt, M. (2012). HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer – How valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Letters*, 323(1), 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.033>

Jennings, L. J., Arcila, M. E., Corless, C., Kamel-Reid, S., Lubin, I. M., Pfeifer, J., Temple-Smolkin, R. L., Voelkerding, K. V., & Nikiforova, M. N. (2017). Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 19(3), 341-365. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>

- Ju, Y., Wu, X., Wang, H., Li, B., Long, Q., Zhang, D., Chen, H., Xiao, N., Li, F., Zhang, S., & Yang, S. (2021). Genomic Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Across Different Anatomic Sites in Chinese Population. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.680699>
- Jun, H. W., Ji, Y. B., Song, C. M., Myung, J. K., Park, H. J., & Tae, K. (2022). Positive Rate of Human Papillomavirus and Its Trend in Head and Neck Cancer in South Korea. *Frontiers in Surgery*, 8. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.833048>
- Kang, S., Bader, A. G., & Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 802-807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408864102>
- Kato, M. G., Baek, C.-H., Chaturvedi, P., Gallagher, R., Kowalski, L. P., Leemans, C. R., Warnakulasuriya, S., Nguyen, S. A., & Day, T. A. (2020). Update on oral and oropharyngeal cancer staging – International perspectives. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 6(1), 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2019.06.001>
- Lawrence, M. S., Sougnez, C., Lichtenstein, L., Cibulskis, K., Lander, E., Gabriel, S. B., Getz, G., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Bowlby, R., Brooks, D., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Cheng, D., Chu, A., Dhalla, N., Guin, R., Holt, R. A., ... International Genomics Consortium. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), Article 7536. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
- Litwin, T. R., Clarke, M. A., Dean, M., & Wentzensen, N. (2017). Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v9080206>
- Litwin, T. R., Clarke, M. A., Dean, M., & Wentzensen, N. (2017). Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v9080206>
- López-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., & Guigó, R. (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Letters*, 579(9), 1900-1903. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.047>
- Lui, V. W. Y., Hedberg, M. L., Li, H., Vangara, B. S., Pendleton, K., Zeng, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Du, Y., Gilbert, B. R., Freilino, M., Sauerwein, S., Peyser, N. D., Xiao, D., Diergaarde, B., Wang, L., Chiosea, S., Seethala, R., Johnson, J. T., ... Grandis, J. R. (2013). Frequent Mutation of the PI3K Pathway in Head and Neck Cancer Defines Predictive Biomarkers. *Cancer Discovery*, 3(7), 761-769. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0103>
- Manda, S. S., Arfa, N., Sharma, N., Parikh, A. R., Roberts, T. J., Limaye, S., Ramachandran, V., Prabhash, K., Kuriakose, M. A., & Kumar, P. (2024). Genomic landscape of head and neck cancer in Asia: A comprehensive meta-analysis of 1016

samples. *Oral Oncology Reports*, 11, 100628.
<https://doi.org/10.1016/j.oor.2024.100628>

Markowska, A., Pawałowska, M., Lubin, J., & Markowska, J. (2014). Signalling pathways in endometrial cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 18(3), 143-148. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.43154>

Maruyama, H., Yasui, T., Ishikawa-Fujiwara, T., Morii, E., Yamamoto, Y., Yoshii, T., Takenaka, Y., Nakahara, S., Todo, T., Hongyo, T., & Inohara, H. (2014). Human papillomavirus and *p53* mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer Science*, 105(4), 409-417.
<https://doi.org/10.1111/cas.12369>

McDaniel, A. S., Hovelson, D. H., Cani, A. K., Liu, C.-J., Zhai, Y., Zhang, Y., Weizer, A. Z., Mehra, R., Feng, F. Y., Alva, A. S., Morgan, T. M., Montgomery, J. S., Siddiqui, J., Sadis, S., Bandla, S., Williams, P. D., Cho, K. R., Rhodes, D. R., & Tomlins, S. A. (2015). Genomic Profiling of Penile Squamous Cell Carcinoma Reveals New Opportunities for Targeted Therapy. *Cancer Research*, 75(24), 5219-5227. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1004>

McLaughlin-Drubin, M. E., Crum, C. P., & Münger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 2130-2135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009933108>

Méndez-Matías, G., Velázquez-Velázquez, C., Castro-Oropeza, R., Mantilla-Morales, A., Ocampo-Sandoval, D., Burgos-González, A., Heredia-Gutiérrez, C., Alvarado-Cabrero, I., Sánchez-Sandoval, R., Barco-Bazán, A., Chilaca-Rosas, F., & Piña-Sánchez, P. (2021). Prevalence of HPV in Mexican Patients with Head and Neck Squamous Carcinoma and Identification of Potential Prognostic Biomarkers. *Cancers*, 13(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/cancers13225602>

Nichols, A. C., Palma, D. A., Chow, W., Tan, S., Rajakumar, C., Rizzo, G., Fung, K., Kwan, K., Wehrli, B., Winkquist, E., Koropatnick, J., Mymryk, J. S., Yoo, J., & Barrett, J. W. (2013). High Frequency of Activating PIK3CA Mutations in Human Papillomavirus–Positive Oropharyngeal Cancer. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 139(6), 617-622. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.3210>

Owens, D., Paleri, V., & Jones, A. V. (2022). Head and neck cancer explained: An overview of management pathways. *British Dental Journal*, 233(9), 721-725. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-5199-1>

Parikh, B. A., Love-Gregory, L., Duncavage, E. J., & Heusel, J. W. (2020). Identification of challenges and a framework for implementation of the AMP/ASCO/CAP classification guidelines for reporting somatic variants. *Practical Laboratory Medicine*, 21, e00170. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2020.e00170>

Perrone, F., Gloghini, A., Cortelazzi, B., Bossi, P., Licitra, L., & Pilotti, S. (2011). Isolating p16- positive/HPV-negative Oropharyngeal Cancer: An Effort Worth Making. *American Journal of Surgical Pathology*, 35(5), 774-777. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182116a45>

Pfister, D. G., Spencer, S., Adelstein, D., Adkins, D., Anzai, Y., Brizel, D. M., Bruce, J. Y., Busse, P. M., Caudell, J. J., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Eisele, D. W., Fenton, M., Foote, R. L., Galloway, T., Gillison, M. L., Haddad, R. I., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., ... Darlow, S. D. (2020). Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(7), 873-898. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0031>

Qiu, W., Schönleben, F., Li, X., Ho, D. J., Close, L. G., Manolidis, S., Bennett, B. P., & Su, G. H. (2006). PIK3CA Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1441-1446. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2173>

Rajendra, S., Wang, B., Merrett, N., Sharma, P., Humphris, J., Lee, H. C., & Wu, J. (2016). Genomic analysis of HPV-positive versus HPV-negative oesophageal adenocarcinoma identifies a differential mutational landscape. *Journal of Medical Genetics*, 53(4), 227-231. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103411>

Rampias, T., Giagini, A., Siolos, S., Matsuzaki, H., Sasaki, C., Scorilas, A., & Psyrri, A. (2014). RAS/PI3K Crosstalk and Cetuximab Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2933-2946. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2721>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405-423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Rietbergen MM, Leemans CR, Bloemena E, Heideman DA, Braakhuis BJ, Hesselink AT, Witte BI, Baatenburg de Jong RJ, Meijer CJ, Snijders PJ, Brakenhoff RH (2013) Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer* 132(7):1565–1571

Robinson, M. (2017). HPV Testing of Head and Neck Cancer in Clinical Practice. En W. Golusiński, C. R. Leemans, & A. Dietz (Eds.), *HPV Infection in Head and Neck Cancer* (pp. 101-111). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43580-0_7

Rusan, M., Li, Y. Y., & Hammerman, P. S. (2015). Genomic Landscape of Human Papillomavirus–Associated Cancers. *Clinical Cancer Research*, 21(9), 2009-2019. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1101>

Sawyer, S. A., Parsch, J., Zhang, Z., & Hartl, D. L. (2007). Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6504-6510. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701572104>

Schmid, S., Gautschi, O., Rothschild, S., Mark, M., Froesch, P., Klingbiel, D., Reichegger, H., Jochum, W., Diebold, J., & Früh, M. (2017). Clinical Outcome of ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients with De Novo EGFR or KRAS Co-Mutations Receiving Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs). *Journal of Thoracic Oncology*, 12(4), 681-688. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.12.003>

Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 445(1-2), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>

Seiwert, T. Y., Burtneess, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., Heath, K., McClanahan, T., Lunceford, J., Gause, C., Cheng, J. D., & Chow, L. Q. (2016). Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): An open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 956-965. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30066-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30066-3)

Seiwert, T. Y., Zuo, Z., Keck, M. K., Khattri, A., Pedomallu, C. S., Stricker, T., Brown, C., Pugh, T. J., Stojanov, P., Cho, J., Lawrence, M. S., Getz, G., Brägelmann, J., DeBoer, R., Weichselbaum, R. R., Langerman, A., Portugal, L., Blair, E., Stenson, K., ... Hammerman, P. S. (2015). Integrative and Comparative Genomic Analysis of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 21(3), 632-641. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3310>

Sichero, L., Tagliabue, M., Mota, G., Ferreira, S., Nunes, R. A. L., Castañeda, C. A., Castillo, M., Correa, R. M., Perdomo, S., Rodríguez-Urrego, P. A., Matos, L. L., Mohssen, A., Gheit, T., Tommasino, M., Chiocca, S., & Villa, L. L. (2022). Biomarkers of human papillomavirus (HPV)-driven head and neck cancer in Latin America and Europe study: Study design and HPV DNA/p16INK4a status. *Head & Neck*, 44(1), 122-133.

Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12(1), 3-20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>

Song, B., Cui, H., Li, Y., Cheng, C., Yang, B., Wang, F., Kong, P., Li, H., Zhang, L., Stegeman, H., Rademakers, S. E., Span, P. N., Takes, R. P., Van Der Kogel, A. J., Kaanders, J. H. A. M., & Bussink, J. (2013). Hypoxia, metabolism, and growth factor signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation between primary and xenograft tumors: Hypoxia, Metabolism, and Growth Factor Signaling in Patient-Xenograft Pairs. *Head & Neck*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/hed.23446>

Spratt, D. E., Chan, T., Waldron, L., Speers, C., Feng, F. Y., Ogunwobi, O. O., & Osborne, J. R. (2016). Racial/Ethnic Disparities in Genomic Sequencing. *JAMA oncology*, 2(8), 1070-1074. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1854>

Stegeman, H., Rademakers, S. E., Span, P. N., Takes, R. P., Van Der Kogel, A. J., Kaanders, J. H. A. M., & Bussink, J. (2013). Hypoxia, metabolism, and growth factor signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation between primary and xenograft tumors: Hypoxia, Metabolism, and Growth Factor Signaling in Patient-Xenograft Pairs. *Head & Neck*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/hed.23446>

Thomas, L. K., Bermejo, J. L., Vinokurova, S., Jensen, K., Bierkens, M., Steenbergen, R., Bergmann, M., von Knebel Doeberitz, M., & Reuschenbach, M. (2014). Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract – A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 50(1), 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.08.022>

Tomaić, V. (2016). Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers*, 8(10), 95. <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>

Vatansever, S., Erman, B., & Gümüş, Z. H. (2019). Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. *Scientific Reports*, 9(1), 11730. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48029-z>

Warren, C. J., Xu, T., Guo, K., Griffin, L. M., Westrich, J. A., Lee, D., Lambert, P. F., Santiago, M. L., & Pyeon, D. (2014). APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus. *Journal of Virology*, 89(1), 688-702. <https://doi.org/10.1128/jvi.02383-14>

Wood, K., Hensing, T., Malik, R., & Salgia, R. (2016). Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non–Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncology*, 2(6), 805-812. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0405>

Zhao, J., Zou, M., Lv, J., Han, Y., Wang, G., & Wang, G. (2018). Effective treatment of pulmonary adenocarcinoma harboring triple EGFR mutations of L858R, T790M, and cis-C797S by osimertinib, bevacizumab, and brigatinib combination therapy: A case report. *OncoTargets and Therapy*, 11, 5545-5550. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170358>

Zheng, S., Wang, X., Fu, Y., Li, B., Xu, J., Wang, H., Huang, Z., Xu, H., Qiu, Y., Shi, Y., & Li, K. (2021). Targeted next-generation sequencing for cancer-associated gene mutation and copy number detection in 206 patients with non–small-cell lung cancer. *Bioengineered*, 12(1), 791-802. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1890382>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00261

Matrícula: 2223803089

Perfil mutacional de
carcinomas de células
escamosas de cabeza y cuello
asociado a virus de papiloma
humano en pacientes
mexicanos.



MARIA FERNANDA PERALTA GONZALEZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER GAYTAN
CERVANTES

VOCAL

DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL ROSARIO CASTRO
OROPEZA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas
del día 25 del mes de marzo del año 2025 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
DR. FRANCISCO JAVIER GAYTAN CERVANTES
DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
DRA. MARIA DEL ROSARIO CASTRO OROPEZA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: MARIA FERNANDA PERALTA GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del
Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad
Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado
resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.