

## Contenido

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
INTODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS .....	5
RESULTADOS.....	7
<b>Tabla 1.</b> Media y frecuencia para candidatos de salud para arqueas. ....	8
<b>Tabla 2.</b> Media y frecuencia para candidatos de enfermedad para arqueas.....	9
<b>Tabla 3.</b> Media y frecuencia para candidatos de enfermedad -virus .....	10
<b>Tabla 4.</b> Media y frecuencia para candidatos de salud -virus .....	10
<b>Tabla 5.</b> Desviación estándar entre virus de grupo control y virus grupo de pacientes con cáncer.....	14
<b>Tabla 6.</b> Primers de candidatos salud y enfermedad.....	15
<b>Tabla 7.</b> Combinación de características sociodemográficas con presencia y ausencia de arqueas.....	16
<b>Tabla 8.</b> Combinación de características sociodemográficas con presencia y ausencia de virus.....	17
Grafica 1. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para arqueas.....	18
Grafica 2. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para virus. .....	18
Grafica 3. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para arqueas y virus.....	19
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

# DETECCIÓN DE ARQUEAS Y VIRUS PRESENTES EN PACIENTES CON CÁNCER ORAL A PARTIR DE ANÁLISIS METAGENÓMICOS

García D.A.<sup>1</sup>; Bernal C.<sup>2</sup>; García M.<sup>3</sup>; Hernández P.<sup>3</sup>

1. PhD Ciencias biológicas PUJ
2. Od. Esp. Patología y Cirugía Bucal PUJ
3. Od. Residente segundo año Patología y Cirugía Bucal PUJ

## RESUMEN

**Antecedentes:** La cavidad oral alberga diversos microorganismos (arqueas, hongos bacterias y virus) constituyentes del microbiota oral; su estudio ha establecido que su disbiosis está relacionada con enfermedades como el Carcinoma Escamocelular Oral (CECO). Gracias a la secuenciación de última generación (NGS) se ha podido estudiar a fondo esta microbiota, pero en CECO, su descripción es escasa. Aunque se han identificado virus y arqueas relacionados con cáncer en otros sitios anatómicos no se ha determinado su presencia de manera diferencial en múltiples microambientes orales, que incluya muestras de pacientes con CECO.

**Objetivo:** Identificar presencia de virus y arqueas presentes en muestras de pacientes con cáncer oral.

**Métodos:** Estudio observacional descriptivo. En muestras de saliva, placa, tumor de 10 pacientes con CECO. saliva y placa de 10 controles, se realizó NGS. A partir de los datos obtenidos se seleccionaron cuatro microorganismos de interés (*Methanobrevibacter sp AbM4*-arquea y *Lactobacillus phague KC5a*-virus asociados a enfermedad y *Candidatus Methanomethylophilus alvus*-arquea, *Campylobacter CP220*-virus asociados a salud) Posteriormente, se realizó PCR convencional para identificar dichos microorganismos en nuevas muestras de tejido tumoral de 36 pacientes con diagnóstico de CECO. Se realizaron análisis cualitativos, cuantitativos y estadístico con la prueba  $X^2$  para determinar diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de estos microorganismos y características sociodemográficas.

**Resultados:** *Mbb*, *Ca alvus*, *Cp220*, *kc5a* fueron positivos en 8%, 25%, 42% y 36%, con una concentración media de 43735, 324.9, 44.03 y 33.68 respectivamente. *Mbb* y *Ca alvus* mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al sexo oral (p: 0.0431) y reflujo gastroesofágico (p: 0.04965) respectivamente.

**Conclusión:** Arquea y virus candidatos de enfermedad tuvieron una frecuencia del 8% y 36% respectivamente. mientras que la arquea y virus relacionados con salud presentaron frecuencia de 25% y 42 %.

**PALABRAS CLAVE:** arquea; carcinoma escamocelular oral; enfermedad; salud; virus.

## ABSTRACT

**Background:** The oral cavity harbors various microorganisms (archaea, fungal bacteria and viruses) constituents of the oral microbiota; His study has established that his dysbiosis is related to diseases such as Oral Squamous Cell Carcinoma (CECO). Thanks to the latest generation sequencing (NGS) it has been possible to study this microbiota in depth, but in CECO, its description is scarce. Although cancer-related viruses and archaea have been identified in other anatomical sites, their presence has not been differentially determined in multiple oral microenvironments, which includes samples from patients with CEOC.

**Objective:** To identify the presence of viruses and archaea present in samples of patients with oral cancer.

**Methods:** Descriptive observational study. In samples of saliva, plaque, tumor of 10 patients with CECO. Saliva and 10 controls plate, NGS was performed. From the data obtained, four microorganisms of interest were selected (Methanobrevibacter sp AbM4-arquea and Lactobacillus phague KC5a-virus associated with disease and Candidatus Methanomethylophilus alvus-arquea, Campylobacter CP220-virus associated with health) Subsequently, conventional PCR was performed to identify these microorganisms in new samples of tumor tissue from 36 patients diagnosed with CECO. Qualitative, quantitative and statistical analyzes were performed with the X2 test to determine statistically significant differences between the presence of these microorganisms and sociodemographic characteristics.

**Results:** Mbb, Ca alvus, Cp220, kc5a were positive in 8%, 25%, 42% and 36%, with an average concentration of 43735, 324.9, 44.03 and 33.68 respectively. Mbb and Ca alvus showed statistically significant differences compared to oral sex (p: 0.0431) and gastroesophageal reflux (p: 0.04965) respectively.

**Conclusion:** Archaea and virus disease candidates had a frequency of 8% and 36% respectively. while archaea and health-related viruses presented a frequency of 25% and 42%.

**keywords:** Archaea; Oral squamous cell carcinoma, Disease, Health; virus.

## INTODUCCIÓN

La microbiota es la población total de microorganismos encontrados en un determinado nicho, ésta compuesta por virus, bacterias, hongos y arqueas. Adicionalmente, ha sido caracterizado en distintas regiones anatómicas como tracto gastrointestinal, cavidad oral, y piel entre otros (1, 2).

La microbiota oral, es una de las más conocidas del cuerpo humano, está compuesto por más de 700 especies de bacterias que cohabitan con virus, arqueas y hongos, en diferentes microambientes dentro de la cavidad oral, por ejemplo, encía queratinizada, amígdalas

palatinas, saliva, placa subgingival, placa supragingival, orofaringe, dorso de la lengua, paladar duro etc. adicionalmente, puede verse influenciada por factores como la dieta, aspectos genéticos del hospedero, incluso el entorno socioeconómico en el que se desarrolló (3, 4)

Actualmente, las enfermedades infecciosas no son observadas como producto de un microorganismo en particular, sino al desequilibrio de la microbiota (disbiosis) como es el caso de la periodontitis, la caries dental y más recientemente el cáncer. Para este último caso, microorganismos como *Helicobacter pylori*, una bacteria involucrada en el desarrollo de cáncer gástrico, ó *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis* y *Capnocytophaga*, estos últimos considerados como posibles candidatos a biomarcadores en cáncer oral (5),

El cáncer oral, ocupa el sexto lugar en los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial, representando el 1.9% de muertes cada año y el 90% de los casos diagnosticados en cavidad oral, comúnmente asociado a hábitos como el consumo de tabaco, alcohol, entre otras debido a la capacidad que tienen estas sustancias de producir modificaciones genéticas que lleven a un daño celular severo(6).

Como se mencionó anteriormente, los virus y arqueas son parte de la microbiota oral. Las arqueas por su parte, son microorganismos poco estudiados en relación con patologías en cavidad oral, en especial en el desarrollo de periodontitis y periimplantitis. La diversidad de arqueas relacionadas con el ser humano no es muy amplia, actualmente se conoce que los dos metanógenos aislados con mayor frecuencia en cavidad oral y tracto gastrointestinal son *Methanobrevibacter oralis* y *Methanobrevibacter smithii* respectivamente(7-14) En cuanto a los virus; estos aunque en su estructura son aparentemente simples la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), cataloga a siete de ellos como “carcinogénicos para los humanos” (grupo 1). Por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (VEB), El Virus de la hepatitis B (VHB), Virus de la hepatitis C (VHC), el Virus del herpes del sarcoma de Kaposi (KSHV), Virus de la inmunodeficiencia humana, tipo 1 (VIH-1), Virus linfotrófico de células T humanas, tipo 1 (HTLV-1) y por último el Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16), debido a que son capaces de alterar mecanismos de inmortalización, inestabilidad genómica, inhibición de la respuesta al daño del ADN, actividad anti-apoptótica entre otros (15, 16).

Poco se han estudiado los virus de la cavidad oral, pero, sí se conoce de la relación que guardan algunos de ellos con el carcinoma escamocelular oral (17) principalmente el virus del papiloma humano, en pacientes jóvenes que no tienen otros factores de riesgo como el hábito de fumar o el consumo de alcohol. Otro virus que se ha mencionado en relación con el cáncer oral es el virus del herpes simple (HSV), ya que se ha evidenciado mayores niveles de anticuerpos contra HSV-1 en pacientes con cáncer oral comparado con pacientes sanos(17-20).

En un estudio reciente, realizado por nuestro grupo se seleccionaron pacientes con cáncer oral y sus respectivos controles para describir la microbiota bacteriana oral diferencialmente encontrada en los dos grupos de análisis, lo cual conllevó a la caracterización de posibles candidatos asociados a salud y enfermedad (cáncer oral). Sin embargo, en este mismo estudio se permitió la identificación de virus y arqueas, resultados que fueron base del presente

estudio para proponer y corroborar posibles candidatos de arqueas y virus asociados al cáncer oral.

Como se puede observar, la mayoría de las investigaciones desarrolladas hasta ahora han mostrado cambios en la microbiota bacteriana. Sin embargo, las bacterias pueden interactuar con otros microorganismos tales como arqueas y virus que influyen principalmente el metabolismo bacteriano y esto conlleva al desarrollo o no de una enfermedad, como el cáncer oral, pero hasta la fecha no existe la descripción de arqueas y virus en este tipo de cáncer, por lo cual el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de virus y arqueas presentes en muestras de pacientes con carcinoma escamocelular oral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional descriptivo, realizado con previa aprobación del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología PUJ; de riesgo medio, sin generación de impactos en el medioambiente. Este proyecto se realizó a partir de resultados previos realizados en el Centro de Investigación Odontológica (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana, donde los investigadores seleccionaron 10 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral, que asistieron al departamento de cirugía de cabeza y cuello en el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) o en el Hospital de Caldas. Los pacientes fueron base para seleccionar a 10 controles, que fueron personas de edad y género similar y que además no presentaran lesiones en cavidad oral al examen clínico. Se tomaron muestras de placa supragingival y saliva, adicionalmente de tejido tumoral en pacientes (casos). Todas las muestras incluidas en el estudio contaron con firma del consentimiento informado.

A todas las muestras incluidas en el estudio previo, se realizó evaluación de calidad mediante geles de agarosa y cuantificación de ADN, mediante fluorimetría y aquellas que cumplieron las condiciones de cantidad ( $>1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y calidad (no se observó degradación) fueron enviadas a la universidad de Wisconsin para realizar las librerías y marcajes de los tags para posteriormente hacer la secuenciación de última generación con Solexa, HiSeq paired-end. Cuando los resultados de todas las muestras se obtuvieron en el formato FASTQc, fueron analizadas. Para ello el primer paso fue ensamblar todas las secuencias por cada muestra, posteriormente todas las secuencias las analizaron en MegaBlast con el fin de identificar secuencias humanas, y removerlas para el análisis final. Luego de que se filtraron los resultados, realizaron alineamientos múltiples utilizando Nucmer y Promer v3.06 y Bowtie entre las tres muestras de cada paciente incluido y entre los distintos individuos utilizando FastUnifrac, finalmente realizaron las anotaciones y asignaciones taxonómicas utilizando Human Oral Microbiome Database (HOMD).

En el presente estudio, a partir de la base de datos generada y una revisión de la literatura, se eligieron dos virus y dos arqueas para ser detectados y cuantificados en muestras de cavidad oral en pacientes con cáncer oral.

La selección de microorganismos, se realizó mediante tablas dinámicas y diagramas de Venn, comparando los virus y arqueas en los diferentes microambientes orales de los pacientes con carcinoma escamocelular oral. Se seleccionaron cuatro microorganismos de interés (2 asociados a carcinoma oral y 2 asociados a salud). Para los microorganismos asociados a cáncer a oral se realizaron comparaciones de virus y arqueas que se encuentran de manera simultánea en al menos dos microambientes orales que incluya tejido tumoral, es decir, (tejido tumoral vs saliva, tejido tumoral vs placa dental, o tejido tumoral vs saliva y vs placa dental).

Posteriormente del listado de microorganismo obtenidos se realizaron comparaciones con aquellos encontrados en placa dental y saliva de controles. Así, todo microorganismo (virus y arqueas) hallado simultáneamente en casos y controles se eliminaron de los candidatos y únicamente los microorganismos que sólo estaban presentes en cáncer oral fueron considerados como candidatos a enfermedad y esta relación se corroboró mediante búsqueda exhaustiva de literatura que soportara su posible relación con cáncer.

Para el caso de los microorganismos candidatos, a procesos saludables, a partir de las comparaciones realizadas, se tuvo en cuenta aquellos que estuviesen presente únicamente en el grupo de controles, El análisis se realizó tanto de forma cualitativa, es decir que se encuentre o no el microorganismo; y de forma cuantitativa, es decir, diferencias numéricas (cantidad de reads) entre las diferentes muestras y grupos de análisis (tablas 1-4).

Una vez escogidos los 4 microorganismos candidatos, (*Methanobrevibacter sp AbM4*-arquea y *Lactobacillus phage KC5a*-virus asociados a enfermedad y *Candidatus Methanomethylophilus alvus*-arquea, *Campylobacter virus CP220*-virus asociados a salud) se procedió a realizar el diseño de los Primers basados en la literatura y corroborados mediante Primerdesign (tabla 6).

Posteriormente, se realizó estandarización de cada PCR convencional para identificar los microorganismos seleccionados en nuevas muestras de tejido tumoral de 36 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral, las cuales fueron tomadas y almacenadas previamente durante la toma de muestras de la primera fase de la investigación. Además, se diseñó un control positivo o constructo, que consistía en un plásmido que contenía los genes blanco de los cuatro microorganismos candidatos. (primer forward y reverse) para realizar una curva con concentraciones desde 1, 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 y 1.000.000 copias.

Las PCR se llevaron a cabo con un volumen final de 25 uLy contenían Master mix (Buffer: 3.25 uL, MgCl<sub>2</sub>: 4.5 uL, DNTPs: 1.5 uL, Primer F: 1 uL , Primer R: 1 uL , DNA Taq: 1 uL, DNA: 3 uL, H<sub>2</sub>O: 9.75 uL)

El protocolo de PCR consistió un ciclo de 95°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 45 segundos, seguido por 58°C para *Mbb*, *Kc5a*, y actina y de 61°C para *cp220* y *Ca alvus* durante 45 segundos, y a 72°C durante 45 segundos y un ciclo final de 72°C durante 2 minutos.

Para 16S rRNA se utilizó el protocolo descrito por Skillman (21) que consistió en desnaturalización a 95° por 3 minutos, posteriormente 6 ciclos de desnaturalización a 95° durante 30 segundos, anillamiento 61° 15s, extensión 72° 30s, 25 ciclos de desnaturalización 95° 15s, anillamiento 61° 5s, extensión final de 72° durante 3 minutos<sup>1</sup>.

Los productos de PCR se evidenciaron a través de gel de agarosa 1.5% y SYBRsafe. Finalmente, la electroforesis se realizó a 100v durante 30 minutos. y los resultados fueron visualizados a través del transiluminador de BioRad.

Para el análisis de las imágenes, se utilizó el programa imageJ, en el cual se obtuvo la densidad correspondiente de cada muestra a través de la cuantificación de píxeles en cada banda por pulgada cuadrada. Posteriormente los datos obtenidos en imageJ fueron analizados en Excel a través de análisis cualitativos y cuantitativos, Para el análisis cualitativo se tuvo como referencia la presencia de una banda del peso molecular esperado y para el análisis cuantitativo, se realizaron curvas de calibración para cada microorganismo analizado, los R<sup>2</sup> obtenidos fueron de *Mbb*=0.95, *Ca alvus*=0.85, *Cp220*=0.95, *Kc5a*=0.97. A partir de la fórmula de cada curva se calculó la concentración (número de copias) para todas las bandas observadas por microorganismo equivalentes en las muestras sometidas a PCR.

Finalmente realizó análisis estadístico a través de la prueba X<sup>2</sup> para determinar diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de microorganismos candidatos y características sociodemográficas de las muestras casos.

## RESULTADOS

La población de la fase inicial consistió en 10 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular, y 10 controles con características sociodemográficas similares. A partir de análisis metagenómicos, se realizaron comparaciones mediante tablas dinámicas. Cada comparación se hizo por orden/phylum, género y especie de virus y arqueas respectivamente.

Los candidatos (salud y enfermedad) fueron seleccionados después de realizar una lista de microorganismos compartidos entre el tejido tumoral con la placa dental y/o saliva de pacientes con cáncer, posteriormente ésta lista fue comparada con los microorganismos presentes en placa dental y saliva del grupo control. Todos los microorganismos que fueron compartidos entre los pacientes con cáncer y el grupo control fueron eliminados. Y aquellos que fueron exclusivos de pacientes eran los candidatos de enfermedad y los exclusivos del grupo control los candidatos de salud.

Finalmente, con el fin de reducir el número de candidatos, se calculó la frecuencia de cada uno de éstos en las muestras correspondientes, eligiendo aquellos microorganismos que tuvieran una frecuencia superior al 80%.

Para arqueas se obtuvieron 14 candidatos para salud y 25 candidatos para enfermedad y para virus 13 candidatos para enfermedad y 43 candidatos de salud (Tablas 1-4).

**Tabla 1.** Media y frecuencia para candidatos de salud para arqueas. Placa Dental (PD), Saliva (S).

<b>SALUD</b>				
<b>Arquea Candidato</b>	<b>PD</b>	<b>S</b>	<b>PD</b>	<b>S</b>
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%	%
<i>Candidatus Methanomethylophilus alvus</i>	0,3	0,1	30	10
<i>Thermococcus cleftensis</i>	0,2	0	20	0
<i>Natronomonas pharaonis</i>	0,2	0	20	0
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	0,2	0	20	0
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	0,2	0	10	0
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	0,1	0	10	0
<i>Thermogladius cellulolyticus</i>	0,1	0	10	0
<i>Picrophilus torridus</i>	0,1	0,4	10	40
<i>Candidatus Nitrosopumilus sediminis</i>	0,1	0	10	0
<i>Methanobacterium paludis</i>	0,1	0	10	0
<i>Aciduliprofundum sp MAR08-339</i>	0	0,2	0	20
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	0	0,2	0	20
<i>Methanotorris igneus</i>	0	0,1	0	10
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	0	0,2	0	20

**Tabla 2.** Media y frecuencia para candidatos de enfermedad para arqueas Placa Dental (PD), saliva (S), tumor (T).

ENFERMEDAD						
Arquea Candidato	PD	S	T	PD	S	T
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%	%	%
<i>Methanococcus vannielii</i>	27,3	36,5	13	100	100	50
<i>Methanococcus voltae</i>	23,8	30,6	10,5	100	100	50
<i>Methanosarcina mazei</i>	13,8	22,6	7,3	100	100	50
<i>Methanosarcina barkeri</i>	9,4	13,8	11,6	100	100	70
<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	7,4	9,2	3	100	100	60
<i>Methanobrevibacter sp AbM4</i>	5,8	8,7	2,9	90	100	50
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	3,9	4,8	3,7	100	90	50
<i>Haloquadratum walsbyi</i>	2,5	2,8	1,1	60	90	40
<i>Methanococcus maripaludis</i>	0,9	1,6	0,2	50	90	20
<i>Natronococcus occultus</i>	5,3	5,3	2,3	100	80	50
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2	2,1	0,4	80	80	20
<i>Methanococcoides burtonii</i>	1,2	1,7	0,9	80	80	40
<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	1,1	1,5	0,6	40	80	30
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	0,6	1,3	0,2	40	80	20
<i>Methanococcus aeolicus</i>	2,3	2,7	1,2	80	70	40
<i>Pyrolobus fumarii</i>	0,2	0,5	0,3	20	50	20
<i>Natrialba magadii</i>	0,6	0,5	0,7	40	40	30
<i>Methanocella conradii</i>	0,3	0,4	0,4	20	40	40
<i>Salinarchaeum sp Harcht-Bsk1</i>	0,2	0,4	0,4	20	30	20
<i>Haloferax volcanii</i>	0,8	0,2	0,1	50	20	10
<i>Methanolobus psychrophilus</i>	0,7	0,2	0,1	50	20	10
<i>Haloferax mediterranei</i>	0,5	0,2	0,2	40	20	20
<i>Halogeometricum borinquense</i>	0,1	0,1	0,1	10	10	10
<i>Methanospirillum hungatei</i>	0	0,1	0,2	0	10	20
<i>Haloarcula marismortui</i>	0,3	0	0,1	20	0	10

**Tabla 3.** Media y frecuencia para candidatos de enfermedad -virus  
Placa Dental (PD), saliva (S), tumor (T).

ENFERMEDAD						
Virus Candidato	PD	S	T	PD	S	T
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%	%	%
<i>Rhadinovirus Saimiriine gammaherpesvirus 2</i>	0,1	0,1	0,1	10	10	10
<i>Rhadinovirus Ateline gammaherpesvirus 3</i>	0,1	0	0,1	10	0	10
<i>Potyvirus Bidens mottle virus</i>	0,1	0,1	0,1	10	10	10
<i>Enterobacteria phage phiX174 sensu lato</i>	0,1	0	0,1	10	0	10
<i>Mamastrovirus Porcine astrovirus 3</i>	0,1	0,1	0,1	10	10	10
<i>Cytomegalovirus Saimiriine betaherpesvirus 4</i>	0,1	0,2	0,2	10	20	20
<i>Alphapapillomavirus 9</i>	0,1	0,1	0,1	10	10	10
<i>Polyomaviridae Adelie penguin polyomavirus</i>	0	0,2	0,1	0	20	10
<i>Pestivirus Giraffe-1</i>	0	0,1	0,1	0	10	10
<i>Choristoneura rosaceana alphabaculovirus</i>	0	0,1	0,1	0	10	10
<i>Mardivirus Gallid alphaherpesvirus 2</i>	0	0,1	0,1	0	10	10
<i>Betabaculovirus Spodoptera litura granulovirus</i>	0	0,2	0,2	0	20	20
<i>Arterivirus DeBrazzas monkey arterivirus</i>	0	0,1	0,1	0	10	10

**Tabla 4.** Media y frecuencia para candidatos de salud -virus  
Placa Dental (PD), saliva (S).

SALUD				
Virus Candidato	PD	S	PD	S
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%	%
<i>Nyavirus Nyamanini nyavirus</i>	0,3	0,2	30	10
<i>Campylobacter virus CP220</i>	0,2	0,3	20	30
<i>T5virus Vibrio phage pVp-1</i>	0,1	0	10	0
<i>T4virus Aeromonas phage phiAS5</i>	0,2	0	10	0
<i>Siphoviridae Rhodococcus phage ReqiPoco6</i>	0,2	0	10	0
<i>Streptococcus phage Sfi19</i>	0,1	0,1	10	10
<i>Streptococcus phage DT1</i>	0,1	0	10	0
<i>Streptococcus phage 7201</i>	0,1	0,1	10	10
<i>Sfi11virus Streptococcus phage Alq132</i>	0,1	0	10	0
<i>Rhadinovirus Bovine gammaherpesvirus 4</i>	0,1	0	10	0
<i>Potexvirus Pepino mosaic virus</i>	0,1	0	10	0

<i>N4virus Erwinia phage Ea9-2</i>	0,2	0	10	0
<i>Thysanoplusia orichalcea nucleopolyhedrovirus</i>	0,1	0	10	0
<i>Iflaviridae Laodelphax striatella honeydew virus 1</i>	0,1	0	10	0
<i>Hp1virus Pasteurella phage F108</i>	0,4	0	10	0
<i>Betaflexiviridae Banana mild mosaic virus</i>	0,1	0	10	0
<i>Ascovirus Heliothis virescens ascovirus 3a</i>	0,1	0	10	0
<i>Varicellovirus Equid alpha herpesvirus 3</i>	0	0,1	0	10
<i>Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus</i>	0	0,1	0	10
<i>Twortvirus Staphylococcus phage Twort</i>	0	0,1	0	10
<i>Tospovirus Capsicum chlorosis virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Spo1virus Listeria phage vB LmoM AG20</i>	0	0,1	0	10
<i>Streptococcus phage M102</i>	0	0,1	0	10
<i>Propionibacterium phage PHL071N05</i>	0	0,2	0	20
<i>Roseolovirus Human beta herpesvirus 7</i>	0	0,2	0	10
<i>Potyvirus Zucchini tigre mosaic virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Potyvirus Wild potato mosaic virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Podoviridae Enterococcus phage vB Efae230P-4</i>	0	1,1	0	10
<i>Phytophthora infestans RNA virus 1</i>	0	0,2	0	20
<i>Pestivirus Aydin virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Myoviridae Pseudomonas phage PPpW-3</i>	0	0,1	0	10
<i>Macavirus Bovine gamma herpesvirus 6</i>	0	0,3	0	30
<i>Iridovirus Invertebrate iridescent virus 6</i>	0	0,1	0	10
<i>Gemycircularvirus Gemycircularvirus SL1</i>	0	0,1	0	10
<i>Cucumovirus Gayfeather mild mottle virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Crinivirus Potato yellow vein virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Alpharetrovirus Fujinami sarcoma virus</i>	0	0,2	0	20
<i>Carlavirus Garlic common latent virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Bymovirus Barley yellow mosaic virus</i>	0	0,1	0	10
<i>Betapapillomavirus Colobus monkey papillomavirus</i>	0	0,2	0	20
<i>Betaentomopoxvirus Choristoneura rosaceana entomopoxvirus 'L'</i>	0	0,1	0	10
<i>Batrachovirus Ranid herpesvirus 2</i>	0	0,4	0	40
<i>Aviadenovirus Fowl aviadenovirus D</i>	0	0,2	0	20

Posteriormente, se realizó una búsqueda de literatura de los candidatos a salud y enfermedad para arqueas y virus. Se realizó una búsqueda bibliográfica asistida por computadora de las bases de datos electrónicas MEDLINE (a través de PUBMED), web of science, Clinical key, SCOPUS (último acceso 15 de junio de 2019) para identificar artículos relacionados con los candidatos, sus huéspedes naturales, su relación con el ser humano, su relación con la salud

y la enfermedad. Se utilizó una combinación de las siguientes palabras de texto para maximizar la especificidad y sensibilidad de búsqueda: **Arqueas** (“*Methanococcus vannielii*”, “*Methanosarcina barkeri*”, “*Methanomethylovorans hollandica*”, “*Methanobrevibacter sp AbM4*”, “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*”, “*Picrophilus torridus*”, “*Methanococcus voltae*”, “*Methanosarcina mazei*”, “*Methanosalsum zhilinae*”). **Virus** (“*Nyavirus Nyamanini nyavirus*”, “*Campylobacter virus Cp220*”, “*Rhadinovirus Saimiriine gammaherpesvirus 2*”, “*Potyvirus Bidens mottle virus*”, “*Mamastrovirus Porcine astrovirus 3*”, “*Alphapapillomavirus 9*”). “infección”, “human”, “oral cancer”, “Mouth Neoplasms”, “Tumors”, “cancer of the mouth”, “Oral disease”, “periodontitis”, “pulpitis”, “endodontics”, “periodontics”, “Squamous cell carcinoma”, “Cancer”, “Disease”, “human infection” relacionándolo con la palabra **and**.

Posteriormente, se eliminaron todos los artículos que involucraran a microorganismos no que fueran parte de nuestra lista de candidatos, pero de los cuales no se conociera relación directa con seres humanos. Finalmente, se eligieron aquellos microorganismos que han sido detectados en muestras de cavidad oral o tracto gastrointestinal a través de técnicas moleculares como secuenciación o PCR.

1. Arquea candidata a enfermedad: De acuerdo al análisis y bibliografía se seleccionó ***Methanobrevibacter***. Sin embargo, la especie en la secuenciación fue asignada taxonómicamente como *abm4*. Respecto a *Methanobrevibacter*, este género de arqueas es considerado como uno de los componentes de la flora bacteriana madura del tracto gastrointestinal(22, 23). Las muestras utilizadas en los diferentes estudios se caracterizan por la presencia diferencial de microorganismos respecto a la especie, siendo *M. oralis* el metanógeno más común en cavidad oral y *M smithii*, el metanógeno frecuente en tracto gastrointestinal. *M. oralis* ha sido asociada a procesos inflamatorios en cavidad oral como periodontitis, periimplantitis y pulpitis(13). Teniendo en cuenta lo anterior, se han realizado estudios con el fin de evaluar la actividad de metanógenos en cavidad oral, obteniendo una relación entre la proporción de estos microorganismos, la presencia de bacterias reductoras de sulfato, profundidad de bolsa y severidad de la enfermedad periodontal(24). Teniendo como soporte la capacidad que tienen las arqueas de establecer colonias en ambientes anóxicos. Por lo tanto, se considera que *M oralis* puede influir indirectamente en patologías en cavidad oral a través de relaciones sinérgicas establecidas con microorganismos conocidos por su patogenicidad, como las bacterias reductoras de sulfato(25).

Por otro lado, según algunos autores, *Methanobrevibacter* es un género de arqueas parte de la flora madura en tracto gastrointestinal y en algunos casos, se ha encontrado cambios en su presencia de acuerdo a algunas patologías que impliquen un aumento en la motilidad intestinal, sin embargo, esta posible relación se debe al desplazamiento usual de la flora cuando aumentan los movimientos peristálticos. De acuerdo con esto, en una investigación realizada por Ghavami, se determinó que es posible utilizar la alteración de *Methanobrevibacter smithii* en colon como un biomarcador para estratificar a los pacientes que tienen enfermedad inflamatoria de colon, pues según ellos, en los pacientes con enfermedad inflamatoria la cantidad de metanógenos se reduce considerablemente en comparación con los pacientes sanos, lo cual podría generar una relación con procesos saludables, pues son microorganismos, que según ésta afirmación, podrían verse alterados en cuanto a cantidad frente a alteraciones en la homeostasis de este sistema(26). Sin embargo,

es necesario tener presente también, que hay estudios que asocian la presencia de arqueas productoras de metano con diferentes procesos patológicos como enfermedad inflamatoria de colon y carcinoma colorectal, sin embargo, aún no hay información concluyente.

2. Arquea candidata a salud: En las muestras de salud, la arquea más frecuente fue *Candidatus Methanomethylophilus alvus*, pertenece al grupo de metanógenos, pero su asignación taxonómica y filogenética asignada recientemente la ubica en el séptimo orden de arqueas, conocido como *Methanomassiliicoccales*. Este orden está dividido en tres grados evolutivos de acuerdo a la ubicación más frecuente de los microorganismos que los componen. *Ca. Methanomethylophilus*, pertenece al segundo grado, en el cual se encuentran los microorganismos presentes en tracto gastrointestinal o cavidad oral(27). Sin embargo, hasta ahora, no se conoce su frecuencia en la población en general, debido a que la mayoría de los estudios incluyen otros géneros de arqueas.
3. Virus candidato a salud: Inicialmente, el candidato fue *Nyavirus Nyamanini nyavirus*, este es un virus de la familia *Nyamiviridae*, género *Nyavirus*. El cual su huésped natural son las aves terrestres en regiones como Egipto, Tailandia, Nigeria, Sri Lanka. Su vector de transmisión son *artrópodos*, específicamente garrapatas infectadas con el virus(28).

En cuanto a su relación con el ser humano, no se reportan o aun no es claro si este virus es capaz de producir infecciones en humanos u otros mamíferos que estén en contacto cercano con las aves infectadas. En un estudio de 120 sueros de niños egipcios con fiebre aguda y 48 convalecientes no se detectaron anticuerpos frente al virus. Y reporta que, en otras poblaciones (bovina, conejos, cabras, burros, camellos, perros callejeros) propios de la región donde se hallaba *Nyamanini nyavirus*, no se encontraron anticuerpos contra este, y en los casos en los que se lograba encontrar anticuerpos, eran valores muy bajos. (29)

Por otro lado, en ratones lactantes o recién nacidos infectados directamente en cerebro con el virus en el laboratorio, se reportó la muerte a los 8 días, mientras que en los conejillos de india adultos 8 días después de la inoculación intracraneal solo se reportaban anticuerpos mas no de enfermedad.(29) por tal razón este virus no se consideró como primera opción para ser el candidato de salud en nuestro estudio.

Siguiendo con *Campylobacter phago virus Cp220* el cual como su nombre lo especifica, es un virus fago de *Campylobacter*. Una bacteria responsable de enfermedades entéricas, que logra causar alteraciones neuronales e incluso la muerte. La cual se encuentra en el tracto gastrointestinal de aves de consumo humano, la cual logra producir enfermedad en el hombre si este se alimenta de pollos infectados. El virus *Cp220* se ha propuesto con buenos resultados como un elemento de control frente a la proliferación de *Campylobacter*, ya que logra cumplir un rol lítico ante la Proteobacteria y de esta manera disminuir su abundancia en aves de engorde(30).

En cuanto a su relación con enfermedad oral *Campylobacter* se ha encontrado en muestras tumorales de pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral y en muestras de saliva de pacientes con lesiones potencialmente malignas con displasia grave(31, 32).

Por ende, si este virus se ha utilizado para controlar la presencia de *Campylobacter* en aves de consumo, se supone que si está en cavidad oral de pacientes sanos puede actuar como un ente regulador de la presencia de una bacteria relacionada con enfermedad tumoral oral.

4. Virus candidato a enfermedad: El virus *Alphapapillomavirus 9* fue el primer candidato, sin embargo, no se encontraron artículos que describieran este tipo viral relacionado con enfermedad tumoral ni oral.

De acuerdo a un análisis adicional, comparamos la cantidad de virus entre el grupo control y grupo de pacientes con cáncer, y aquellos virus que superarán 1 desviación estándar (aumentados en pacientes con cáncer oral) fueron nuestros candidatos (Tabla 5). Donde el virus *Lactobacillus phage KC5a* presento una desviación estándar en pacientes de 20,23, desviación estándar en controles de 3,4.

Este virus es un fago de *Lactobacillus*, bacterias que hacen parte de la microbiota normal vaginal, por lo que se han utilizado a lo largo de la historia como probióticos, para controlar las enfermedades bacterianas causadas por disbiosis en el microbiota vaginal(33).

Incluso se han reportado en muestras de placa bacteriana y en muestras de materia fecal de personas sanas, dichas cepas de *Lactobacillus* tenían poco o casi nulo potencial patógeno, es más, por su producción de ácido láctico y bacteriocina demostraron potencial probiótico en el equilibrio del microbiota oral de pacientes sanos, ya que evitan colonización de bacterias patógenas sobre el epitelio oral(34) por esta razón se contempló que *Kc5a* es un virus que en alta actividad bacteriófaga sobre su bacteria huésped, disminuiría la concentración de bacterias protectoras.

Además reforzamos nuestra hipótesis basándonos en el estudio de Asoudeh-Fard A. 2017, donde demostró el potencial anticancerígeno que tiene *Lactobacillus plantarum* sobre las células KB de cáncer oral, a través de la eficaz regulación positiva de la vía PTEN (Homólogo de Fosfatasa y Tensina) involucrada en la inhibición del cáncer. Y la regulación negativa sobre la vía MAPK (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno) la cual es participe en el inicio del cáncer(35).

**Tabla 5.** Desviación estándar entre virus de grupo control y virus grupo de pacientes con cáncer.

Desviación estándar (D.E.)

Virus	D.E. Pacientes	Promedio Pacientes (%)	D.E. Controles	Promedio Controles (%)
<i>Streptococcus phage PH10</i>	21,64	9,7	2,71	2,5
<i>Lactobacillus phage KC5a</i>	20,23	6,4	3,4	1,1
<i>Lactobacillus phage phi jlb1</i>	7,90	2,5	0,31	0,1
<i>Lactobacillus prophage Lj771</i>	6,00	1,9	1,26	0,5
<i>Haemophilus phage Aaphi23</i>	4,42	1,4	0,96	0,4
<i>Streptococcus phage phiBHN167</i>	4,42	1,4	0,31	0,1

Una vez seleccionados los virus y arqueas candidatas a procesos saludables y a enfermedad (cáncer oral), se dispuso al diseño de los primers, mediante la utilización de la herramienta primerdesign<sup>®</sup> y estandarización de las PCRs. En la tabla 6 se muestran las secuencias de cada uno de los primers.

**Tabla 6.** Primers de candidatos salud y enfermedad

MICROORGANISMO	TAMAÑO PRODUCTO	SECUENCIA PRIMERS		UBICACIÓN	PROTEÍNA
		FORWARD	REVERSE		
<i>Campylobacter phage Cp220</i>	216	TCAGGAGCTCAATGTTCTGGT	CCTATCGTGTACAGTAGGTATGCT	5407-5940	Hypothetical phage protein
<i>Lactobacillus phage KC5a</i>	134	CGGCACTATATAACTCGGCGT	CAATCGTGTAGTAGTCCGCA	121-1242	Integrase
<i>Candidatus Methanomethylophilus alvus Ca. alvus</i>	205	TTCACACCCCAGTACGAAGG	AAGGCGATTCTGTTATCCCCG	2261-2466	Glutación Peroxidasa
<i>Methanobrevibacter Mbb</i>	259	CTAGCCCAGAAACCTGTCCG	CCAGGCTCTCCAGCATTACC	1864538-1864777	Molecular chaperone DnaJ

Luego de seleccionar una muestra de 36 tejidos tumorales de pacientes con cáncer oral, se realizó detección y cuantificación de cada microorganismo en las muestras seleccionadas.

Dicha muestra consistía en 36 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral de los cuales 21 eran hombres y 15 mujeres. 12 pacientes en el rango de edad entre 35-55. 13 pacientes entre 56-70 años y 11 en el rango de edad entre 71- 90 años. 5 pacientes de estrato socioeconómico alto, 16 medio, 11 de estrato socioeconómico bajo y 4 pacientes no lo reportaron.

15 pacientes manifestaron haber tenido de 1 a 2 parejas sexuales, 10 reportaron de 3 a 6 parejas sexuales, 8 pacientes manifestaron 7 o más parejas sexuales. Mientras que 3 pacientes no reportaron esta información. 17 pacientes negaron prácticas de sexo oral, 9 lo afirmaron. 5 eran fumadores activos. 4 pacientes fueron fumadores pasivos, 10 pacientes consumían alcohol, 9 padecían de reflujo gastroesofágico y 13 recibieron algún tipo de medicación los últimos 15 días antes de la toma de la muestra.

En el análisis cualitativo y cuantitativo los geles de agarosa se observaron que el 8 % de las muestras fueron positivos para *Mbb* con un número de copias de 34182 a 54594 y una media de 43735. 25 % fueron positivos para *Ca alvus* con un número de copias de 75 a 520 y una media de 324,9. 36 % fueron positivos para *Kc5a* con un número de copias de 7 a 209, Media de 33,68. Y por último 42 % fueron positivos para *Cp220* con un número de copias de 23 a 99 con una media de 44,03

**Tabla 7.** Combinación de características sociodemográficas con presencia y ausencia de arqueas.

*Methanobrevibacter (Mbb)*, *Candidatus Methanomethylophilus alvus (Ca. Alvus)*

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	Mbb		Mbb		P	Ca. alvus		Ca. alvus		P
	(+)		(-)			(+)		(-)		
	n	%	n	%	P	n	%	n	%	P
<b>CASOS</b>	3	8	33	91	0.0596	9	25	27	75	0.5117
<b>SEXO</b>										
Femenino	2	66	13	39	0.3590	3	33	12	44	0.5582
Masculino	1	33	20	60	0.3590	6	66	15	55	0.5582
<b>RANGO DE EDAD</b>										
35 - 55	0	0	12	36	0.2873	1	11	11	40	0.2160
56 - 70	1	33	12	36	0.2873	5	55	8	29	0.2160
71 -90	2	66	9	27	0.2873	3	33	8	29	0.2160
<b>ESTRATO</b>										
Alto	1	33	4	12	0.3704	-	-	5	18	0.2414
Medio	2	66	14	42	0.3704	3	33	13	48	0.2414
Bajo	0	0	11	33	0.3704	4	44	7	25	0.2414
<b>PAREJAS SEXUALES</b>										
1 A 2	2	66	13	39	0.2788	3	33	12	44	0.8479
3 A 6	0	0	10	30	0.2788	3	33	7	25	0.8479
7 O MÁS	-	-	8	24	0.2788	2	22	6	22	0.8479
<b>SEXO ORAL</b>										
NO	-	-	17	51	0.0431	4	44	13	48	0.9400
SI	2	66	7	21	0.0431	2	22	7	25	0.9400
<b>FUMADOR</b>										
NO	3	100	25	75	0.3336	5	55	23	85	0.0641
SI	0	0	8	24	0.3336	4	44	4	14	0.0641
<b>FUMADOR PASIVO</b>										
NO	3	100	24	72	0.3241	9	100	18	66	0.0581
SI	0	0	8	24	0.3241	0	0	8	29	0.0581
<b>CONSUMO DE ALCOHOL</b>										
NO	3	100	17	51	0.1056	4	44	16	59	0.4386
SI	0	0	16	48	0.1056	5	55	11	40	0.4386
<b>REFLUJO GASTROESOFAGICO</b>										
NO	1	33	17	51	0.6033	6	66	12	44	0.04965
SI	1	33	8	24	0.6033	-	-	9	33	0.04965
<b>MEDICACION</b>										
NO	2	66	21	63	0.9167	6	66	17	62	0.8412
SI	1	33	12	36	0.9167	3	33	10	37	0.8412

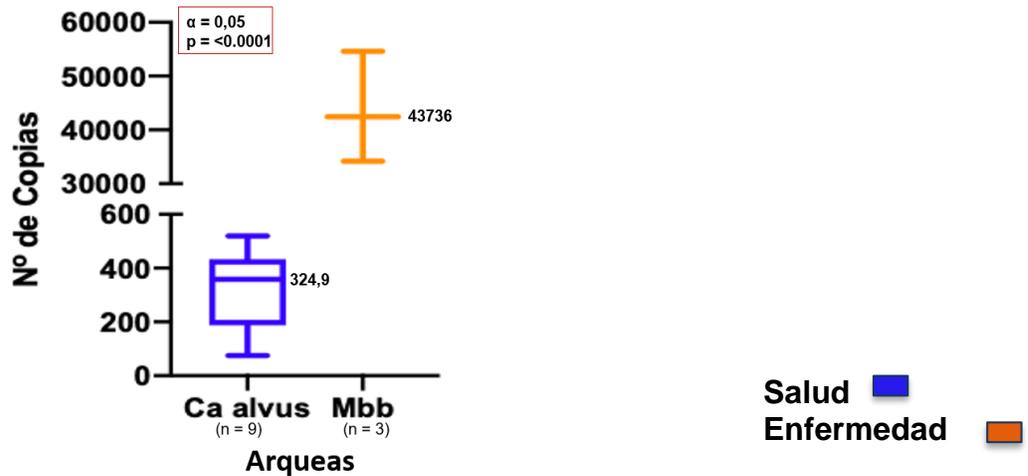
**Tabla 8.** Combinación de características sociodemográficas con presencia y ausencia de virus.

*Lactobacillus phage KC5a (KC5a), Campylobacter phage Cp220 (Cp220).*

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	KC5a		KC5A		P	CP220		CP220		P
	(+)		(-)			(+)	(-)			
	n	%	n	%	P	N	%	n	%	P
<b>CASOS</b>	13	36	23	63	0.6339	15	41	21	58	0.1266
<b>SEXO</b>										
Femenino	5	38	10	43	0.7693	5	33	10	47	0.3914
Masculino	8	61	13	56	0.7693	10	66	11	52	0.3914
<b>RANGO DE EDAD</b>										
35 - 55	4	30	8	34	0.1878	5	33	7	33	0.9418
56 - 70	7	53	6	26	0.1878	5	33	8	38	0.9418
71 -90	2	15	9	39	0.1878	5	33	6	28	0.9418
<b>ESTRATO</b>										
Alto	1	7	4	17	0.8072	2	13	3	14	0.9285
Medio	5	38	11	47	0.8072	7	46	9	42	0.9285
Bajo	4	30	7	30	0.8072	4	26	7	33	0.9285
<b>PAREJAS SEXUALES</b>										
1 A 2	4	30	11	47	0.0796	5	33	10	47	0.7374
3 A 6	6	46	4	17	0.0796	4	26	6	28	0.7374
7 O MÁS	1	7	7	30	0.0796	4	26	4	19	0.7374
<b>SEXO ORAL</b>										
NO	5	3	12	52	0.4434	8	53	9	42	0.5004
SI	4	30	5	21	0.4434	3	20	6	28	0.5004
<b>FUMADOR</b>										
NO	8	61	20	86	0.0781	12	80	16	76	0.7864
SI	5	38	3	13	0.0781	3	20	5	23	0.7864
<b>FUMADOR PASIVO</b>										
NO	11	84	16	69	0.1394	12	80	15	71	0.7274
SI	7	53	7	30	0.1394	3	20	5	23	0.7274
<b>CONSUMO DE ALCOHOL</b>										
NO	6	46	14	60	0.3934	9	60	11	52	0.6501
SI	7	53	9	39	0.3934	6	40	10	47	0.6501
<b>REFLUJO GASTROESOFAGICO</b>										
NO	7	53	11	47	0.7781	7	46	11	52	0.7818
SI	3	23	6	26	0.7781	4	26	5	23	0.7818
<b>MEDICACION</b>										
NO	7	53	16	69	0.3456	10	66	13	61	0.7693
SI	6	46	7	30	0.3456	5	33	8	8	0.7693

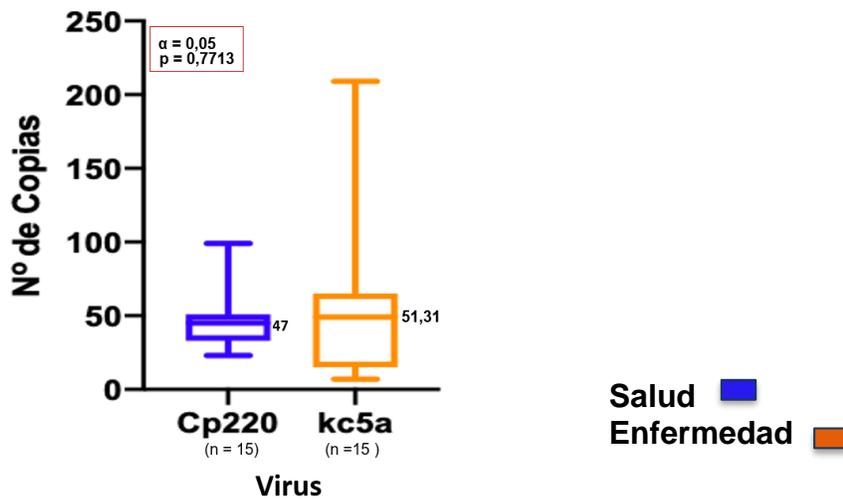
Grafica 1. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para arqueas.

Media de *Ca alvus* 324,9 N° de copias. Media de *Mbb* de 43736 No de copias. Valor de p: < 0.0001.



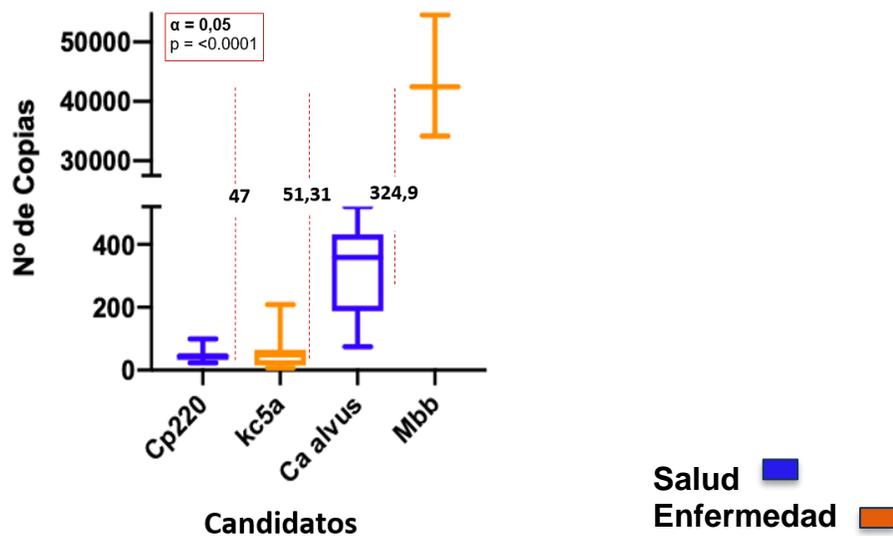
Grafica 2. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para virus.

Media de *Cp220* de 47 N° de copias. Media de *Kc5a* de 51,31. N° de copias. Valor de p: 0,7713



Grafica 3. Relación concentración de candidatos de salud y enfermedad para arqueas y virus.

Media de *Cp220* vs *Kc5a*, *Ca alvus* y *Mbb* de 44 N° de copias. Media de *Kc5a* vs *Ca alvus* y *Mbb* de 51,31. Media entre *Ca alvus* y *Mbb* de 324,9 N° de copias. Valor de p: < 0.0001 para *Mbb* vs *Ca alvus*, *Kc5a*, *Cp220*. Valor de p: >0.9999 para *Cp220* vs *kc5a*. valor de p: 0,9928 para *Cp220* vs. *Ca alvus*, valor de p: 0,9937 para *kc5a* vs. *Ca alvus*.



De las 36 muestras de tumor, *Mbb* fue positivo en 3 de estas, los tres pacientes correspondientes fueron asignados a rangos de edad comprendido entre los 70 y 85 años, pertenecientes a un nivel socioeconómico medio y alto, no fumadores. Se observó diferencia estadísticamente significativa en la relación que existe entre la presencia de éste microorganismos y prácticas sexuales, con un valor de p de 0.0431.

Respecto *Ca. alvus*, se observó la presencia de este microorganismo en 9 pacientes, de los cuales 3 son mujeres. No se observó relación entre la presencia de este microorganismo y los hábitos o edad de los pacientes. Sin embargo, se observó que existe relación entre su presencia y el reflujo gastroesofágico.

En cuanto a virus asociado a enfermedad, de las 36 muestras, solamente en 13 se amplificó *Kc5a*, de los cuales 8 eran mujeres, 7 se encontraban en el rango de edad de 56 a 70 años, 6 referían haber tenido de 3 a 6 parejas sexuales, 4 practican sexo oral, 5 son fumadores activos, 7 consumían alcohol. Sin embargo, ninguno de estos resultados mostró diferencias estadísticamente significativas para nuestro estudio.

En cuanto al virus relacionado con salud, 15 muestras fueron positivas, de los cuales 10 eran hombres, 5 tenían de 1 a 2 parejas sexuales, 3 practicaban sexo oral, 3 eran fumadores y 6 reportaron consumo de alcohol. Sin representar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

Posteriormente se decidió valorar las posibles relaciones que podían encontrarse entre los cuatro microorganismos en cada una de las muestras. Análisis en el cual se observó que: al relacionar los virus y arqueas relacionados con enfermedad, ningún paciente tenía en la muestra a los dos microorganismos. Respecto a los microorganismos de salud *cp220* y *Ca alvus* se observó su presencia concomitante en 5 pacientes, 2 de estas mujeres. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características sociodemográficas.

En la comparación entre *mbb* y *cp220*, se observó la presencia de los dos microorganismos en 1 paciente. Dentro de sus características se encuentran: hombre, rango de edad entre 71 a 90 años, de nivel socioeconómico alto y no indica el número de parejas sexuales, no fumador, consumidor de alcohol. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas variables.

En la relación entre *Kc5a* y *Ca. alvus*, 6 pacientes presentaron esta combinación, de estos 4 eran hombres, 2 estaban en el rango de edad de 71 a 90 años, 3 de 56 a 70 años y 1 de 35 a 50 años, 2 eran de nivel socioeconómico medio y dos de nivel socioeconómico bajo. En cuanto al número de parejas sexuales, 2 pacientes tenían de 3 a 6 y 1 reportó tener más de 7, 2 reportaron tener sexo oral, 3 fumadores, 4 eran consumidores de alcohol y tres recibieron medicación en los últimos 15 días. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

## DISCUSIÓN

Las arqueas son parte del microbioma oral y su importancia radica en que han sido asociadas a procesos inflamatorios en cavidad oral y tracto gastrointestinal. En este estudio se valoró como candidato asociado a procesos patológicos a *Methanobrevibacter abm4* tuvo una concentración superior a los otros microorganismos observados en este estudio, pero tuvo una frecuencia mucho más baja, tan solo del 8% en tejido tumoral, en comparación con el 50% obtenido en las muestras de tumor analizadas a través de secuenciación inicialmente. *Mbb abm4* pertenece al mismo grupo de microorganismos que ha sido mencionado en otros estudios de cavidad oral y tracto gastrointestinal, en los cuales se han descrito especies como

*M smithii* y *M oralis*, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, al igual que en esas dos especies, es probable que *Mbb abm4* comparta gran similitud genética (23).

Actualmente no hay descripción de arqueas en lesiones malignas de cavidad oral, sin embargo, se han realizado estudios en pacientes con patologías premalignas o malignas en tracto gastrointestinal, en los cuales se ha observado la frecuencia de metanógenos a través de la excreción de metano por cromatografía de gases obteniendo como resultado una frecuencia de 31% en pacientes con colitis ulcerosa (patología asociada a un aumento en el riesgo de padecer carcinoma colorectal) en comparación enfermedad de Chron, en la cual la frecuencia fue del 10%. (36). En otro estudio en el que se valoró la frecuencia a través de PCR se observó que ésta era de 45-50% en pacientes con carcinoma colorectal. En comparación con este estudio, la frecuencia de arqueas en carcinoma colorectal es más alta respecto a las muestras que fueron sometidas a PCR, sin embargo, el valor si coincide con la frecuencia en las muestras que fueron secuenciadas en el estudio actual. (9)

Los estudios relacionados con microorganismos metanógenos y patologías en cavidad oral, están limitados patologías inflamatorias como periodontitis, lo cual puede tener una estrecha relación con la conformación de un nicho que favorece el crecimiento de éstos microorganismos a través la generación de un microambiente anóxico en el cual pueden cohabitar con otras especies de bacterias que favorecen la transferencia de hidrógeno interespecies y consecuentemente la producción de metano por parte de las arqueas, mecanismo que también se aplica en tracto gastrointestinal. Adicionalmente, según Baker et al aunque las arqueas son microorganismos extremófilos las condiciones de temperatura (37°) y presencia de metabolitos facilitan el proceso de colonización por parte de estos microorganismos.(8)

Contrario a lo anterior, en otros estudios en los que se ha detectado la presencia de éste microorganismo a través de PCR, se ha sugerido que *Methanobrevibacter* es parte de la microbiota madura del tracto gastrointestinal y que puede ser utilizado como biomarcador de patologías inflamatorias por la disminución en la concentración de éstas en pacientes enfermos en comparación con tejidos sanos (26).

En los estudios en los que se asocian las arqueas con patologías no se describen los posibles mecanismos fisiopatológicos que tendrían estos microorganismos, sin embargo, en una investigación realizada por Bang et al, se observó que las arqueas que pertenecen al género *Methanobrevibacter* y *Methanosphaera* pueden generar una activación de células dendríticas y citoquinas en mucosa de tracto gastrointestinal, pero aún no se conocen patrones moleculares asociados a arqueas y este proceso sigue en estudio. Por lo tanto, como conclusión de la mencionada investigación, se sugirió que el rol que puede desempeñar este género de arqueas en patogenicidad es indirecto, pues su función como aceptor terminal de otras especies, favorece la remoción de metabolitos e intensifica la actividad microbiana de bacterias que puedan ser patógenas y generar una respuesta inflamatoria de mayor dimensión(37).

Hasta este momento, se ha observado a través de PCR que la frecuencia de éste género en cavidad oral es de 20 a 40%, con una disminución de ésta tan pronto se modifican las condiciones del microambiente patológico en el que se encuentren. (38). Por lo tanto, en relación con los resultados de éste estudio, se podría considerar que no todas las superficies tumorales pueden favorecer el crecimiento de éstos microorganismos. Sin embargo, es posible considerar que en otros casos, aquellos en los cuales la concentración fue más alta, los tejidos tumorales hayan generado un microambiente tan conveniente para los metanógenos como el que brindan las bolsas periodontales(5) Según lo anterior, se podría considerar que las condiciones físicas de la superficie tumoral pueden desempeñar un rol importante en la frecuencia y concentración de arqueas en este estudio (39).

Para la arquea asociada a procesos saludables, fue *Candidatus Methanomethylophilus alvus*, (*Ca alvus*) microorganismo con un aumento en la frecuencia respecto a las primeras muestras, en las cuales solo tuvo 30% en pacientes sanos y no se encontró en las muestras de tejido tumoral secuenciadas inicialmente. En las muestras sometidas a PCR se observó una frecuencia superior, lo cual no coincide con los resultados esperados. Actualmente se tiene poco conocimiento acerca de ésta especie, sin embargo, se conoce la asignación taxonómica y filogenética es reciente y la ubica en el séptimo orden de arqueas, conocido como *Methanomassiliicoccales*. Este orden está dividido en tres clados evolutivos de acuerdo a la ubicación más frecuente de los microorganismos que los componen. *Ca. Methanomethylophilus*, pertenece al segundo clado, en el cual se encuentran los microorganismos presentes en tracto gastrointestinal o cavidad oral. Pese a que es parte del microbiota de cavidad oral, hasta ahora no se cuenta con datos que permitan comparar la frecuencia obtenida en este estudio a través de PCR. Sin embargo, en una investigación realizada por Brugere et al. se sugiere que los microorganismos que pertenecen al género *Methanomassiliicoccales* podrían ser implementados como probióticos de siguiente generación por el rol que desempeñan en la disminución de los niveles de trimetilamina (TMA) y TMAO (predictores de riesgo de sufrir eventos cardiovasculares como aterosclerosis e infarto de miocardio). Según este investigador, estos microorganismos codifican aminoácidos que catalizan la actividad de TMA, impidiendo que su oxidación y generación de TMA induzca la producción de células espumosas y cambios en la composición y cantidad de ácidos biliares, con lo cual se reduciría el riesgo de aterosclerosis. De acuerdo con esto, es posible que éste microorganismo participe en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota en cavidad oral y que el aumento en su frecuencia se vea relacionado con un mecanismo de protección o la relación que puede tener este microorganismo con otras especies.(40)

Como se puede observar, el rol que desempeñan los metanógenos en los procesos de enfermedad no es claro aún. La evidencia no es concluyente. En algunos estudios se considera que los microorganismos que pertenecen al género *Methanobrevibacter* pueden estar involucrados indirectamente en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y otros autores consideran que la disminución en la concentración de éstos puede ser considerado como un biomarcador de patologías. Por lo tanto, es posible que se requiera de estudios en los cuales se observe cuáles bacterias cohabitan en el tejido para observar su comportamiento respecto a microorganismos con los cuales puedan establecer relaciones sinérgicas.

Está claro que los virus son uno de los componentes del microbiota oral, a su vez se menciona que los bacteriófagos son el tipo de virus que se encuentran con mayor riqueza dentro de este grupo de microorganismos. Los bacteriófagos, virus bacterianos o fagos como también se les conoce, son virus cuyo huésped natural son las bacterias, que también forman parte de la microbiota oral. Estos logran de una manera u otra alterar la ecología o el “ecosistema” de dicha microbiota, ya que pueden cumplir un rol de protección o depredador para sus huéspedes.

Logran integrarse dentro del genoma de la bacteria y propagarse cada vez que esta también lo haga sin producir lisis bacteriana ni replicar viriones, esta manera de interactuar con el huésped se le conoce como ciclo templado o lisogénico, de tal modo, el profago evita que otro bacteriófago lítico sobreinfecte la bacteria y en consecuencia estará casi que inmune ante la lisis bacteriana mediada por bacteriófagos. El rol antagonista lo cumplen infectando bacterias y generando lisis de esta, con el fin de replicarse y propagarse a través de viriones. (41).

El candidato de salud *Campylobacter virus cp220* fue positivo en 42 % de las muestras. No se ha reportado la presencia de este microorganismo en muestras de pacientes con carcinoma escamocelular u otros tipos de cáncer. Pero si existe el reporte de *Campylobacter*, bacteria huésped de este virus en tal neoplasia. En un estudio realizado en pacientes con diagnóstico de Carcinoma escamocelular oral se evidencio que el género *Campylobacter* en conjunto con otros 17 géneros bacterianos, fueron los más abundantes representaron > 80%, además comparando dichos pacientes con sus respectivos controles el género *Campylobacter* fue uno de los géneros que demostró un aumento estadísticamente significativo frente a los controles, en los cuales la presencia de la bacteria tendía a ser bajos o nulos (42).

Otro estudio donde se secuencio ADN tomado a partir de frotis realizados sobre lesión lingual en 36 pacientes con hallazgo de leucoplasia oral, una lesión premaligna que antecede el carcinoma escamocelular oral y como control tomaron muestra de frotis del lado contralateral sano del mismo paciente. Se evidenció el incremento significativo en la abundancia de *Campylobacter spp.* (p 0.0069) en muestras de leucoplasia vs lado contralateral sano. Así mismo 50% de los pacientes presentaron características citológicas de displasia severa, microbiológicamente en dicho grupo se halló predominio de la especie *Campylobacter concisus* vs displasias moderadas y leves  $P < 0,044$ . (43)

Adicionalmente otro estudio realizado en 25 muestras de biopsias tumorales de carcinoma escamocelular oral y 27 controles de pólipos fibroepiteliales. El ADN extraído de las muestras se secuenció con Illumina y los resultados mostraron que *Campylobacter concisus*, estuvo con mayor frecuencia en las muestras de carcinoma escamocelular. En cuanto a *Campylobacter* fago Pride et al 2012(44) indicaron que los bacteriófagos de la cavidad oral predominan es estados lisogénicos, por lo que podríamos sugerir que *Cp220* se encuentra en fase templado con *Campylobacter sp* y por tal razón se presentó en tal proporción en el presente estudio.

El candidato de enfermedad *Lactobacillus phage KC5a* fue positivo en 36 % de las muestras, con una media de 33,68 número de copias. Aunque no se hallaron otros estudios que identificaran dicho virus en muestras de cáncer oral u otro tipo de cáncer mediante

secuenciación de última generación sabemos que su bacteria huésped, *Lactobacillus gasseri* se ha reportado en lesiones malignas orales.

En un estudio donde se tomaron muestras de saliva a 25 controles y 19 pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, de los cuales 47% eran carcinoma escamocelular oral y 58% carcinoma escamocelular de orofaringe. Mediante técnicas de secuenciación de ADN y PCR cuantitativa, *Lactobacillus gasseri* presentó un aumento significativo en paciente casos frente a los controles con un valor de  $p < 0,0001$ . Pero los autores sugieren que su presencia no es propia, sino que ha migrado desde la vagina su ambiente natural, por medio de prácticas sexuales. Sin embargo, en las muestras de dichos paciente se reportaba la presencia del virus del papiloma humano, a lo que atribuyen el diagnóstico tumoral (32).

En el presente estudio el 36% de la muestra que fue positiva para *Lactobacillus phage KC5a*, refirió prácticas de sexo oral sin diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, puede ser el medio por el cual migre a cavidad oral la bacteria *Lactobacillus gasseri* y consigo el fago *Lactobacillus phage KC5a*.

Frente a reportes de enfermedad y la presencia de *Lactobacillus phage* un estudio en el que se identificaron a través de cultivo bacteriano y posterior Secuenciación del gen 16S rRNA cepas de lactobacillus en una muestra de 69 mujeres sanas y 75 con flujo vaginal anormal. Reporto primeramente *Lactobacillus jensenii* 24%, *Lactobacillus crispatus* 22%, *Lactobacillus iners* 10%, *Lactobacillus gasseri* 10% y *Lactobacillus vaginalis* 9%. Complementario a esto mediante Aislamiento de bacteriófagos y microscopía electrónica, identificaron bacteriófagos endógenos de *L. jensenii* (29%) cuya bacteria se relacionó con flora normal junto a *L. gasseri*. y el bacteriófago endógeno de *L. crispatus* (77%), bacteria relacionada con vaginosis bacteriana. Quien sugiere la presencia de los bacteriófagos por vínculos de lisogenia con sus bacterias huéspedes. (45)

Existe el reporte de otros estudios que también han identificado los virus más frecuentes en muestras tumorales de regiones anatómicas diferentes a la cavidad oral. Como el estudio de Nakatsu y col 2018, realizado en especímenes fecales de 111 pacientes con cáncer colorrectal (CCR) y 112 controles sanos mediante secuenciación. En sus resultados reportan que el género viral con mayor expresión fue *Orthobunyavirus* con un aumento de 1,26%, un género descrito como virus de ARN, que tiene la capacidad de infectar humanos, cuyo vector de transmisión son los mosquitos y el cual no se ha descrito en enfermedades del tracto gastrointestinal, pero si está vinculado a alteraciones febriles y hemorrágicas(46).

## CONCLUSIONES

- La arquea candidata de enfermedad *Mbb* tuvo una frecuencia del 8%, mientras que la arquea relacionada con salud *Ca alvus* presento una frecuencia de 25%. En cuanto a

virus el candidato de Salud Cp220 tuvo una frecuencia de 42 % y el virus candidato de enfermedad *Kc5a* se encontró con una frecuencia de 36 %.

- Las características sociodemográficas de esta muestra como el sexo, la edad, el estrato socioeconómico, el número de parejas sexuales, el hábito de fumar, el consumo de alcohol, y el consumo de medicamentos no tienen relación con la presencia de *Kc5a*, *Cp220*, *Mbb*, *Ca alvus*,
- Sin embargo, en este estudio se observó que la práctica de sexo oral puede estar relacionado con la presencia de *Mbb*, el reflujo gastroesofágico puede estar relacionado con la presencia de *Ca alvus*.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio con muestras controles y evaluar su presencia y cantidad en muestras de tejido sano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Methé B.A., Nelson K.E., Pop M., Creasy H.H., Giglio M.G., Huttenhower C., et al. A framework for human microbiome research. *nature*; 2012. p. 215-21.
2. WG. W. The oral microbiome in health and disease.: *Pharmacological Research*.; 2013. p. 137-43.
3. Fordtran. S. *Enfermedades digestivas y hepáticas*. 2017.
4. Samaranayake, Matsubara, H. V. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. . *Dental Clinics of North America* 2015. p. 199-215.
5. Ali J, Sabiha B, Ullah H, Adnan J, A. K. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncology*; 2017. p. 23-8.
6. Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, Nagy E, HN N. The microflora associated with human oral carcinomas.: *Oral oncology*. p. 304-8.
7. Miller T.L., Wolin M.J., Macario C, A.J M. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces.: *Applied and Environmental Microbiology*.; 1982. p. 227-32.
8. Baker JL BB, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria.: *Trends in Microbiology* 2016;. p. 365-74.
9. Scanlan PD, Shanahan F, JR M. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis.: *BMC MICROBIOLOGY*; 2008.
10. Li CL, Liu DL, Jiang YT, Zhou YB, Zhang MZ, Jiang W, et al. Prevalence and molecular diversity of Archaea in subgingival pockets of periodontitis. *Oral Microbiology Immunology*; 2009. p. 343-6.

11. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N. Newly Identified Pathogens Associated with Periodontitis. . 2014. p. 843-58.
12. Robichaux M, Howell M, R. B. Growth and Activities of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Human Oral Cavity. . *Curr Microbiol.* ; 2003.
13. Faveri M, Gonçalves LFH, Feres M, Figueiredo LC, Gouveia LA, Shibli JA ea. Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri - implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. 2011. p. 388-44.
14. B D. Laboratory tools for detection of archaea in humans. . *Clin Microbiol Infect*; 2012. p. 825-33.
15. S. P. *Viruses.*: Elsevier; 2017.
16. Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse, Secretan B., El Ghissassi F., et al. Una revisión de carcinógenos humanos - parte B: agentes biológicos. . *Lancet Oncol*; 2009. p. 321-2.
17. E.J. S. The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa.: *Oral Oncology*; 2009. p. 351-5.
18. Martinez R.C.-P ea. Clinicopathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young patients. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.; 2018. p. 332-6.
19. Kelly G.L., A.B. R. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. . *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2007. p. 277-84.
20. Cruz I., Van Den Brule A., Brink A., al: e. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. . *Int J Cancer* 2000. p. 356-61.
21. Skillman L, Evans P, Naylor G, Morvan B, Jarvis G, K. J. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs.: *Anaerobe*; 2014. p. 277-85.
22. Hu Huynh HTT, Pignoly M, Nkamga VD, Drancourt M, G A. The Repertoire of Archaea Cultivated from Severe Periodontitis.: *PLoS ONE*; 2015.
23. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPPA, HP H. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.*; 2006. p. 1274-82.
24. Matarazzo F, Costa Ribeiro A, Feres M, Faveri M, Alves P, M. M. Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. . *J of Clinical Periodontology*; 2011. p. 621-8.
25. Robichaux M, Howell M, R. B. Methanogenic Activity in Human Periodontal Pocket.: *Current Microbiology*; 2003. p. 53-8.
26. Shaghayegh Baradaran Ghavamia, Elham Rostamia, Abbas Akhavan Sephayb, Shabnam Shahrokhc, Hedieh Balaiic, Hamid Asadzadeh Aghdaeic, et al. Alterations of the human gut *Methanobrevibacter smithii* as a biomarker for inflammatory bowel diseases. . *Microb Pathog.*; 2018. p. 285-9.
27. Horz HP, G. C. Methanogenic Archaea and oral infections ways to unravel the black box.: *J of Oral Microbiology*; 2011.
28. M. B. Genetic relationships between Bovine Herpesvirus 4 and the Gammaherpesviruses Epstein-Barr Virus and Herpesvirus Saimiri. . *VIROLOGY* 1992. p. 654-5.

29. Efstathiou. S. Murine herpesvirus 68 is genetically related to the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri.: Journal of general Virology; 1990. p. 1365-72.
30. Jäckel C, Hammerl JA, Reetz J, Kropinski AM, S. H. Campylobacter group II phage CP21 is the prototype of a new subgroup revealing a distinct modular genome organization and host specificity.: BMC Genomics; 2015. p. 16-62.
31. Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, et al. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. J Dent Res. ; 2018. p. 725-32.
32. Guerrero-Preston R, White JR, Godoy-Vitorino F, Rodríguez-Hilario A, Navarro K, González H, et al. High-resolution microbiome profiling uncovers *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus gasseri/johnsonii*, and *Lactobacillus vaginalis* associated to oral and oropharyngeal cancer in saliva from HPV positive and HPV negative patients treated with surgery and chemo-radiation. 2017. p. 110931–48.
33. Perez-Brocá V, A. M. The analysis of the oral DNA virome reveals which viruses are widespread and rare among healthy young adults in Valencia (Spain). . PLoS ONE . ; 2018.
34. al. CYBe. Adaptation and Probiotic Potential of Lactobacilli, Isolated from the Oral Cavity and Intestines of Healthy People. . Probiotics & Antimicro. Prot. ; 2018.
35. Asoudeh-Fard. A. Lactobacillus plantarum induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signalling pathways. . Bioimpacts. . 2017. p. 193-8.
36. Peled Y WD, Hallak A , Gilat T . Factors affecting methane production in humans. Gastrointestinal diseases and alterations of colonic flora. . Dig Dis Sci.; **1987**. p. 267-71.
37. Bang C, Weidenbach K, Gutschmann T, Heine H., RA. S. The Intestinal Archaea Methanosphaera stadtmanae and Methanobrevibacter smithii Activate Human Dendritic Cells. PLoS ONE; 2014.
38. Sogodogo E, Doumbo O, Aboudharam G, Kouriba B, Diawara O, Hapssa Koita H, et al. First characterization of methanogens in oral cavity in Malian patients with oral cavity pathologies. BMC Oral Health; 2019.
39. Lira EAG, Ramiro FS, Chiarelli FM, Dias RR, Feres M, Figueiredo LC, et al. Reduction in prevalence of Archaea after periodontal therapy in subjects with generalized aggressive periodontitis. Australian Dental Journal; 2013. p. 442–7.
40. Brugère JF, Hania WB, Arnal ME, Ribière C, Ballet N, Vandekerckove P, et al. Archaea Microbial Candidates in Next-generation Probiotics Development. Clin Gastroenterol; 2018. p. 71-3.
41. . BJ. A bacteriophages journey through the human body.: Immunol Rev. ; 2017. p. 106-22.
42. Zhao H , Chu M , Huang Z , Yang X , Ran S, Hu B Variations in oral microbiota associated with oral cancer. Sci Rep.
43. Amer A, Galvin S, Healy CM, GP. M. The Microbiome of Potentially Malignant Oral Leukoplakia Exhibits Enrichment for *Fusobacterium* , *Leptotrichia* , *Campylobacter* , and *Rothia* Species. Front Microbiol; 2017.

44. Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, RA. W. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. . ISME J. ; 2012.
  45. Damelin L , Paximadis M , Damelin D , Birkhead M , D L, C. T. Identification of predominant culturable vaginal Lactobacillus species and associated bacteriophages from women with and without vaginal discharge syndrome in South Africa.: J Med Microbiol 2011. p. 180-3.
  46. G N, H Z, WKK W, SH W, OO C, Dai Z , et al. Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. . Gastroenterology; 2018.
-