

Tipificación del virus del Papiloma humano en Neoplasias Epiteliales malignas de cavidad bucal.

Papillomavirus Typing In Human Malignant Epithelial Neoplasms Of Oral Cavity.

Tipificação Do Vírus Do Papiloma Em Neoplasias Malignas Epiteliais Da Cavidade Oral.

Virginia C. Rosende de Guiroy¹ | Ofelia Zibelman de Gorodner² | Horacio Lucero³
Araldo Rafael Vallejos⁴

Fecha de Recepción

29 de junio de 2010

Aceptado para su publicación

15 de julio de 2010

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue detectar y tipificar el virus del papiloma humano en neoplasias epiteliales malignas de cavidad bucal, y comparar los tipos hallados con los de mayor incidencia y más vinculados con neoplasias malignas de mucosa genital.

Se analizaron dos tipos de muestras: las primeras obtenidas a través de hisopados bucales de pacientes con diagnóstico presuntivo o confirmado de neoplasias epiteliales malignas de cavidad bucal, que concurren al Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Ángel Roffo” Buenos Aires y las segundas, obtenidas de biopsias incluidas en tacos de parafina, de pacientes diagnosticados en el Servicio de Patología y Citodiagnóstico del Hospital “J. R. Vidal”, Corrientes. Para ello se aplicaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR – RFLP.

Los resultados obtenidos indicaron que existe un 38% de infección por HPV en las muestras analizadas, de las cuales la mayoría presentaban baja carga viral, y sólo 6 casos pudieron ser tipificados, dando patrones indeterminados.

Palabras Claves

HPV, PCR RFLP, carcinoma epidermoides.

Summary

The purpose of this study was to detect and to genotype the human papillomaviruses in malignant oral tumours and compare them with the most frequently detected HPV types in malignant genital tumours.

Two kinds of samples were analyzed: one of them

¹ Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Fisiología Humana – Facultad de Odontología - UNNE.

E-mail: virrosende@yahoo.com.ar

² Prof. Titular Cátedra de Histología y Embriología – Facultad de Medicina – UNNE.

³ Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Infectología – Facultad de Medicina – UNNE y Jefe del Servicio de Biología Molecular – Instituto de Medicina Regional – UNNE.

⁴ Prof. Titular Cátedra Anatomía Patológica – Facultad de Odontología – UNNE.

obtained through oral scraped from patients with presumptive or confirmed malignant oral tumours diagnostic, detected at the Head and Neck Department from "Angel Roffo" Institute of Oncology, Buenos Aires. And the other, obtained from paraffin-embedded biopsy specimens from patients diagnosed at the Pathology and Citodiagnostic Department from "J.R.Vidal" Hospital, Corrientes. To get them polymerase chain reaction technique and PCR-RFLP were used.

The results obtained indicate that exists a 38% of HPV infection in the analysed samples, and most of them presented low viral charge, only 6 samples were able to be genotyped and undetermined patterns were given.

Keywords

Human papillomaviruses, PCR- RFLP, malignant oral tumours.

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi detectar e caracterizar o vírus do papiloma humano em neoplasias malignas epiteliais da cavidade oral, e comparar as taxas encontradas com maior incidência e mais associadas com neoplasias malignas na mucosa genital.

Foram analisados dois tipos de amostras: a primeira, obtida através de zaragatoas bucais de pacientes com diagnóstico presuntivo ou confirmado de neoplasias malignas epiteliais da cavidade oral, que participaram do Serviço de Cabeça e Pescoço do Instituto de Oncologia "Angel Roffo" Buenos Aires e em segundo lugar, obtido a partir de biópsias incluídas em blocos de parafina de pacientes diagnosticados na Patologia e Citodiagnóstico do Hospital J.R.Vidal, Corrientes. Para isso, foram aplicadas técnicas de reação em cadeia (PCR) e PCR - RFLP.

Os resultados obtidos mostraram que existe 38% de infecção por HPV em amostras, das quais a maioria tinha baixa carga viral e apenas seis casos foi possível estabelecer, dando indeterminado.

Palavras chaves

HPV, PCR RFLP, carcinoma de células escamosas.

Introducción

El rol de los virus en la etiología del cáncer oral es materia de especulación desde hace largo tiempo¹.

Ha quedado muy bien establecida la intervención de algunos virus en la aparición espontánea del cáncer y en la inducción experimental de éste en animales, pero a pesar de las importantes asociaciones epidemiológicas entre estos agentes infecciosos y diversas neoplasias humanas, todavía no se ha demostrado de manera inequívoca que algún virus sea el causante primario de un cáncer humano².

Silverman divide a los virus que tienen potencial oncogénico conocido en dos grupos: los herpesvirus y los papillomavirus¹. De los grupos virales mencionados es tema de nuestra investigación el virus del papiloma humano (HPV).

El objetivo de la presente investigación fue detectar y tipificar el virus del papiloma humano en neoplasias epiteliales malignas de cavidad bucal, y comparar los tipos hallados con los de mayor incidencia y más vinculados con neoplasias malignas de mucosa genital.

Revisión de Antecedentes

Generalidades del virus

Los HPV están extendidos en toda la población, produciendo tumores epiteliales de la piel y las membranas mucosas³. Son virus epidermotropos⁴.

Componen el género papillomavirus de la familia papovaviridae, son virus sin envoltura de 50-55 nm de diámetro con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros de distribución oblicua⁵ que encierran un genoma de DNA circular de doble cadena⁶⁻³.

Hasta el presente se han identificado al menos 100 tipos de HPV⁷ y se reconocieron muchos otros, en un trabajo sobre vacunas contra HPV se menciona más de 130 genotipos⁸. De los cuales 24 tipos se asocian a lesiones orales⁹. Los HPV son huésped-específicos y cada tipo se asocia en gran medida con un proceso histopatológico particular³.

Los diferentes tipos se clasifican en tres grupos de acuerdo a su potencial oncogénico y al tipo de lesión que producen¹⁰ basándose en neoplasias intraepiteliales cervicales. Bonne y varios auto-

res los agrupan en los de mayor riesgo HPV tipos 16 y 18, los de riesgo intermedio HPV tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51 y 52 y los de menor riesgo los tipos 6, 11, 42 y otros^{3,11}.

Patogénesis

La patogenia de la enfermedad por HPV ha sido analizada por varios autores¹³⁻¹⁶. El ciclo de vida del virus del papiloma humano difiere del de otros virus de la familia, ya que este virus requiere infectar las células epiteliales de epidermis o mucosas que tiene la posibilidad de proliferar (capa basal)¹⁷. Aunque se conoce poco sobre el primer estadio de la infección por HPV, se supone que el ciclo replicativo del virus comienza con el ingreso de partículas dentro del estrato germinativo. A medida que las células basales se diferencian y progresan hacia la superficie del epitelio, el DNA del HPV se replica y se transcribe y las partículas virales son ensambladas en el núcleo. Por último, los viriones completos se liberan cuando los queratinocitos muertos se descaman.

Epidemiología y manifestaciones clínicas de la infección

Las lesiones pueden observarse clínicamente entre 3 semanas a 8 meses después de la infección y suelen presentarse como proliferaciones epiteliales conocidas como verrugas, resultado de la estimulación viral de la proliferación celular⁸. La infección por HPV es inicialmente asintomática y la transmisión puede ocurrir en la etapa preclínica⁷. Se ha detectado HPV en mucosa oral normal¹⁸.

El HPV puede producir lesiones benignas y malignas a nivel de cavidad bucal. Dentro del grupo de las benignas, se encuentran el papiloma plano, las verrugas vulgares, el condiloma acuminado, la enfermedad de Heck o Hiperplasia Epitelial Focal, y actualmente se lo vincula con las leucoplasias, como agente causante o como coinfección. Dentro del grupo de las lesiones malignas, produce carcinoma verrugoso y es un cofactor en la producción de carcinomas epidermoides bucales.

El carcinoma epidermoide es la enfermedad maligna más común en la cavidad bucal. Generalmente se presenta en labio inferior, lengua y piso de boca. Según sus características macroscópicas puede ser de tres tipos: exófitico superficial, infiltrativo/ulcerativo y fungoide¹⁹.

El carcinoma verrugoso es una variante del carcinoma espinocelular bien diferenciado,²⁰ representa el 5% de los carcinomas escamosos intrabucales, se localiza con mayor frecuencia en cavidad bucal y laringe.

Carcinogénesis

Luego de su entrada al organismo y de llegar al área a afectar, se produce la fijación del virus por receptores proteicos o lípidos de la membrana celular que responden particularmente a la estructura de la envoltura proteica viral. Abandona su cápside, y penetra en la célula¹⁴ liberándose al citoplasma, donde se produce la síntesis o replicación en el núcleo de la célula epitelial por estimulación de síntesis de DNA celular. El genoma viral se manifiesta tanto en las etapas tempranas como en las tardías⁵ con la incorporación de histonas del huésped en el virión.

Investigaciones realizadas en Harvard Medical School¹⁶ y en la Universidad de California²¹ determinaron que el rol del HPV en la carcinogénesis oral está soportado por la habilidad de los HPV de alto riesgo de inmortalizar queratinocitos orales in vitro. También se menciona que la conversión maligna de los queratinocitos inmortalizados está asociada con la inestabilidad genética²¹. El cáncer surge de la proliferación clonal de una población de células que van acumulando alteraciones genéticas de una forma progresiva²².

Tipos de HPV vinculados con el cáncer oral

El cáncer intraoral representa alrededor del 6% de todos los cánceres de la economía. Su incidencia varía según la ubicación geográfica²³. Según Reguezi el carcinoma de células escamosas, bucal y bucofaríngeo, representa alrededor de 3% del total en hombres y 2% en mujeres. La proporción hombres y mujeres actualmente es de casi 2 a 1⁵.

Además menciona que las muertes causadas por cáncer bucal y bucofaríngeo representan casi 2% del total en hombres y 1% en mujeres. La tendencia de supervivencia es de 50%⁵.

Los principales factores de riesgo, asociados al cáncer intraoral son: tabaquismo, alcoholismo, consumo de betel, fenómenos de inmunosupresión,²³ las condiciones bucales deficientes como las prótesis defectuosas y los agentes virales como el virus del papiloma humano²⁰.

Los tipos de virus HPV que presentan potencial

oncogénico a nivel genital son los tipos HPV16 y HPV18, 24 - 26 entre otros. Estos mismos tipos están siendo vinculados con el cáncer oral²⁷⁻³⁰. También se observó la presencia de HPV 1131 y 6^{32,33,24,26} en carcinomas verrugosos de cavidad bucal utilizando PCR e hibridación dot blot en algunos casos y otros con sondas biotinizadas.

Métodos y Técnicas Empleados

Se recolectaron 62 muestras obtenidas por hisopados de lesiones con diagnóstico presuntivo o confirmado de neoplasias epiteliales malignas de boca de pacientes asistidos en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” de la Ciudad de Buenos Aires, las cuales fueron suspendidas en buffer de PBS para su posterior procesamiento.

Además se analizaron 56 casos de biopsias de lesiones epiteliales malignas de la cavidad bucal diagnosticados durante el período comprendido entre el 01-01-97 y el 31-12-99 en el Servicio de Patología y Citodiagnóstico del Hospital Dr. José R. Vidal (Corrientes). Las mismas fueron fijadas en formol e incluidas en parafina.

La técnica de diagnóstico que se utilizó es la de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Se realizó la amplificación por PCR usando los primers genéricos MY 9 y 11 que amplifican un fragmento de 450 pb dentro de la región L1.

Las muestras de tacos parafinados se analizaron microscópicamente para seleccionar los que presentaban características histológicas de HPV. Luego se realizó la desparafinización de los cortes de tejido con xilol; la extracción de ADN se realizó de dos maneras: extracción con bromuro de cetil trimetilamonio, con purificación y extracción con buffer de digestión con proteinasa K con o sin purificación.

A las muestras de hisopados se les realizó la extracción de ADN con bromuro de cetil trimetilamonio con purificación, y extracción con buffer de digestión con proteinasa K con purificación.

En ambos tipos de materiales se realizó la amplificación del ADN por PCR. Los productos amplificados fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 3%, y observados en transiluminador previa tinción con bromuro de etidio.

Además se realizó amplificación de control interno de integridad de ADN extraído: amplificación del gen de β globina.

Las muestras positivas fuertes para HPV fueron sometidas a la técnica PCR – RFLP para tipificar al virus utilizando las siguientes enzimas de restricción; Bam HI, DdeI, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI, y Sau3AI. Fueron evaluados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó documentación fotográfica de PCR y de PCR - RFLP.

Resultados

Se tomaron 62 muestras de hisopados bucales procedentes del Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Ángel Roffo”, de la Ciudad de Buenos Aires. Se extrajo material genómico y se realizó amplificación por PCR de todos ellos. Una vez que se realizó la extracción del material genómico de las muestras de hisopado con bromuro de cetil trimetilamonio y su posterior amplificación por PCR tanto para HPV como para el gen de β -globina, se observó que 57 casos eran β -globina positivos, 35 HPV negativos y 22 HPV positivos; en los 5 casos restantes el material fue insuficiente para realizar el estudio.

Cuadro 1: Resultados de PCR de hisopados bucales procedentes del Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Ángel Roffo”.

Hisopados	HPV +	HPV -	Material insuficiente*
62	22	35	5

* Corresponde a muestras que presentaron baja carga genómica.

Los métodos de extracción testeados en estas muestras fueron satisfactorios en cuanto a la cantidad de ADN extraída, evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa. Inclusive la técnica con CTAB extrajo mayor cantidad de material genómico.

También se identificaron 56 casos de carcinoma bucal, cuyos materiales se hallaban incluidos en tacos de parafina. De ellos 24 presentaban características histopatológicas de lesiones por HPV y cuatro eran dudosos.

Cuadro II: Análisis histopatológico de biopsias de carcinomas epidermoides bucales del Servicio de Patología y Citodiagnóstico del Hospital “Dr. J. R. Vidal”.

Biopsias	HPV +	HPV -	Dudosos
56	24	28	4

Luego de realizar la PCR específica para HPV de 20 de estas muestras que presentaban características histopatológicas de HPV, ninguna de ellas presentó la banda correspondiente en gel de agarosa (450pb). También se realizó el control interno de amplificación del gen de β - globina, el que tampoco demostró bandas del amplicón correspondiente (289 bp).

En base a este control se concluyó que los métodos de extracción de ADN no arrojaron cantidades suficientes de ADN molde que sirviera para la amplificación con primers específicos de HPV. El total de muestras recolectadas fue de 118, siendo 77 las sometidas a análisis por PCR y 6 genotipificadas.

Cuadro III: Total de muestras de ambos tipos de materiales.

Tipos de muestras	Nº	Estudiadas por PCR	Genotipificadas
Biopsias	56	20	0
Hisopados bucales	62	57	6
Totales	118	77	6

Analisis Estadísticos

El análisis estadístico se realizó en base a los datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes que concurrieron al Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología “Ángel Roffo”, de quienes se tomaron las muestras de hisopados bucales. Todos los datos fueron registrados en una planilla en Excel. Para el análisis se utilizó el programa InfoStat 2007 propiedad de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste. Y se realizaron estadísticas descriptivas, gráficos y análisis de correspondencias (basado en la distancia Chi-cuadrado).

Del total de muestras analizadas se encontró una incidencia de 2 a 1 de carcinoma epidermoide según sexo, presentándose con mayor frecuencia en el sexo masculino.

La localización más frecuente fue en lengua para ambos sexos.

El rango etario más afectado fue el de 59 a 69 años, incluyendo 25 casos. Y lo sucedió el de 48 a 58 años. Estos resultados coincidieron para ambos sexos.

La infección por HPV se presentó en igual porcentaje en ambos sexos. En el femenino 37,5 % y en el masculino 39%.

No se observó preferencia de localización en los casos HPV positivos ni en los negativos.

Discusión

En el total de casos analizados hallamos una incidencia de carcinoma epidermoides de 2 a 1 respecto al sexo, con predominio en el sexo masculino. Con una mayor incidencia entre los 59 y 69 años. La localización más frecuente fue en lengua.

De acuerdo al análisis de nuestros resultados podemos inferir que las muestras de biopsias no presentaban aptitudes suficientes. Una probabilidad es que no hubieran sido fijadas correctamente para la técnica de PCR en el momento de la toma de la muestra, habiéndose empleado para ello un formol no bufferado y que por esto nuestros resultados fueron desfavorables.

Los resultados negativos obtenidos en las muestras parafinadas, tanto en las PCR de control interno para β globina, que detecta ADN celular, como en las PCR específicas para HPV podrían atribuirse a que el ADN resultara deteriorado por esta deficiente fijación.

En cambio, las muestras de hisopados pudieron ser perfectamente procesadas; en ellas se observó un 38% de infección de HPV, aunque esto no es suficiente para determinar que el virus esté directamente vinculado con la carcinogénesis o bien sea un factor que al sumarse a otros contribuye a la producción de carcinomas bucales.

Nuestro resultado se asemejó al del trabajo realizado por Koppikar y otros donde estudiaron 102 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello y 102 pacientes sanos como grupo control. Ellos detectaron HPV en el 31% del grupo de estudio y solo en el 5% del grupo control³⁴.

Smith, Ritchie y col realizaron una investigación similar, sobre un total de 201 pacientes con cáncer de cabeza y cuello y 333 individuos en el grupo control. Estudiaron los diferentes factores de riesgo para el desarrollo de cáncer y la correlación con infección por HPV: Detectaron HPV de alto riesgo en el 22,9% de los pacientes y en el 10,8% en el grupo control. El HPV 16 fue el más hallado, 19% y 10% en cada grupo respectivamente. Compararon los resultados en el grupo que presentaba otros factores de riesgo con el que no los tenía y concluyeron que la infección por HPV es un factor independiente del alcohol y del tabaco en la producción del cáncer. Y además determinaron que produce sinergismo con el consumo de alcohol³⁵.

En contraposición, en la presente investigación, por presentar baja carga viral no se pudo tipificar en gran parte el material HPV positivo. Esto puede deberse a dos motivos: que la técnica de hisopado bucal no obtenga suficiente material, o que en esta muestra el virus no se encuentre infectando con mucha intensidad a la mucosa bucal.

El estudio multicéntrico realizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (Internacional Agency for Research on Cancer - IARC), incluyó un total de 1670 pacientes con cáncer (1415 con cáncer oral y 255 con cáncer de orofaringe) y un grupo control de 1732 individuos. Estudió muestras de sangre y células exfoliadas de todos los participantes, y biopsias de los pacientes con cáncer. Este grupo de trabajo halló que en el 90% de los pacientes de quienes se obtuvo muestras de biopsia positivas para HPV, fueron HPV negativos en las muestras de células exfoliadas. Concluyeron que las células exfoliadas no son lo suficientemente representativas³⁶.

Schwartz y col. obtuvieron resultados similares, estudiaron 284 casos de cáncer oral, y 477 individuos como grupo control. Analizaron células de descamación de ambos grupos y biopsias del primero. Detectaron que el 26% (43 casos) de los tumores presentaron infección por HPV. En cambio, solo el 9,3% de los cepillados bucales fueron positivos en el grupo de estudio y el 9,2% del grupo control. Este grupo de investigación también halló diferentes resultados en el mismo grupo según el material de estudio.³⁷ De los 43 casos de biopsias tumorales, 41 fueron HPV 16 positivos solo o combinado, y dos HPV 18 sin combinaciones. En los estudios de las célu-

las exfoliadas se encontró una incidencia poco significativa de los HPV oncogénicos en ambos grupos.

En cambio, en el trabajo realizado en el Departamento de Epidemiología de la Universidad de Iowa, evaluaron un total de 193 pacientes con cáncer oral por medio de biopsias y células de descamación encontrando una prevalencia del 20% para los HPV de alto riesgo. Identificaron HPV tipo 16, 18 y 33. Concluyeron que la realización de un test citológico a las células exfoliativas orales fue un importante predictor de los HPV de alto riesgo en el cáncer y que puede llegar a ser un interesante biomarcador temprano de tumores infectados³⁸.

En la Facultad de Odontología de la Universidad Católica Pontificia de Porto Alegre, Brasil, realizaron un estudio sobre la detección de HPV en diferentes tipos de leucoplasias y de liquen plano oral. Analizaron células de descamación de mucosa oral por nested PCR en 71 casos de liquen plano y 68 de leucoplasias, hallando una incidencia de muestras HPV positivas de 19,7% y 17,6%, respectivamente³⁹.

En este estudio, de las muestras que pudieron ser tipificadas, en su mayoría presentaban genotipos indeterminados. Por lo tanto nuestra hipótesis de que los tipos infectantes en mucosa genital, y vinculados con carcinomas genitales coincidirían con los de mucosa bucal no pudo ser confirmada. Sería importante continuar con esta línea de investigación, ya reconocidos los inconvenientes y diseñando un proyecto de estudio prospectivo que incluya las modificaciones necesarias para superarlos.

Conclusión

En base a los resultados obtenidos se puede decir que en este grupo de estudio el virus del papiloma humano está presente en un tercio de los carcinomas epidermoides de la boca.

Cabe considerarlo como un cofactor más en la producción de cáncer oral.

El material obtenido a partir de muestras de hisopados bucales no tiene suficiente carga viral como para realizar las tipificaciones que permitan establecer su rol específico, en el desarrollo de carcinomas epidermoides orales, tal como ocurre en el tracto genital inferior.

Teniendo en cuenta todo esto consideramos que

es necesario realizar un nuevo trabajo prospectivo, donde se utilice material de biopsia fijado adecuadamente para aplicar técnicas de biología molecular.

Bibliografía

1. Silverman Sol Jr. Oral Cancer. Fourth Edition. American Cancer Society 1998. Cap 2. Pp. 19 - 24.
2. Rubin Farber. Patología. Editorial Médica Panamericana 1990. Pp. 156 - 159.
3. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. 5° Edición. Vol. 2. Editorial Médica Panamericana. BsAs. Argentina 2002. Pp. 1991 - 2002.
4. Morando J. Compendio de Pediatría. Editorial El Ateneo 2001. Pp 918.
5. Reguezi J. Patología Bucal. 2° Edición. Edit Mc Graw-Hill Interamericana. 1995. Pp 71 - 83, 184 - 201.
6. Harrison Faucibraunald. Principios de Medicina Interna. 14° Edición. McGraw-Hill-Interamericana 1998. Pp. 1258 - 1260.
7. León Cruz G, Bosques Diego O, Infección por el Virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. La Habana - Cuba Rev. Cubana Obstet Ginecol; 2005; 31 (1) pp 0 - 0. online.
8. Sanclemente G, Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano. Gac. Méd Méx. 2003; Vol. 139 N° 2: 173-183.
9. Castros T M P G, R, Neto C E, Scala K, et al. Oral manifestations related to papillomavirus (hpv). Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2004 Vol 70 N° 4 - 546 - 550.
10. Ball E. Virus Papiloma Humano. Biología Molecular, Genética y Mecanismos Oncogénicos. Parte I. Dermatología Venezolana Vol 36 N° 4 1998. Caracas. Pp. 136 - 141.
11. Sand L, Jalounli J, Larsson PA, Hirsch JM. "Human papilloma viruses in oral lesions" Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Faculty of Odontology, Goteborg University, Sweden. Anticancer Res 2000; 20 (2B): 1183 - 8.
12. Summersgill K, Smith E, Kirchner H, Haugen T, Turek L. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000; 90 (3): 334 - 9.
13. Shin K, Park K, Hong H, Kim J, Oh J, Choung P, Min B. Prevalence of microsatellite instability inactivation of mismatch repair genes p53 mutation and human Papillomavirus infection in Korean oral cancer patients. Korea Int J. Oncol. 2002; 21 (2): 297 - 302.
14. Besuschio S. Patología General. Editorial El Ateneo 1992. Pag 158 - 159.
15. Alonio V, Dalbert D, Picconi M, Cervantes Vazquez G, Garcia Carranca A, Distefano A, Mural J, Bartt O, Bazan G, Teysse A. Mutaciones en genes Ha-ras y p53 detectadas mediante PCR-SSCP en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino asociadas con virus papiloma humano. Medicina (Bs.As.) 2000; 60: 895 - 901.
16. Surgerman P, Shillitoe E. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. Charlestown, MA, USA Oral Di. 1997; 3 (3): 130 - 47.
17. Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from Basic studies to clinical application. Nature Reviews. Cancer 2002 Vol. 2; N° 5, 342 - 350.
18. Ha P, Califano J, The rol of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15 (4): 188 - 196.
19. Paparella, Shumrick D, Gluckman J, Meyerhoff W. Otorrinolaringología Cabeza y cuello. Vol. III 3° Edición. Editorial Médica Panamericana. 1994 Pp. 2385 - 2399.
20. López Chapín A. Factores de Riesgo Etiopatogénicos del Carcinoma Verrugoso en Cavidad Bucal. Acta Odontol. Venez. 2000; Vol 38, N° 2 pp. 9 - 14.
21. Shin K, Tannyhill R, Liu X, Park N. Oncogenic transformation of HPV-immortalized human oral keratinocytes is associated with the genetic instability of cells. Los Angeles California USA Oncogene 1996; 12(5): 1089 - 96.
22. Rodrigo Tapia J, Suarez Nieto C, Sanchez Lazo P, Ramos S, Coto E, Alvarez V, Alvarez Alvarez I, Garcia Gonzalez L, Martinez Sánchez J. Alteraciones moleculares en los carcinomas epidermoides de la orofaringe. Acta Otorrinolaringol. Esp 2001; 52: 24 - 31.
23. Capdeville F F. Tumores malignos de cavidad oral. Operación comando. Reconstrucción mandibular. Rev. Chilena de Cirugía 2005; Vol. 57 - N° 1, pp. 7 - 18.
24. Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: A novel method of detection. London, U.K. Oral Oncol. 1998; 34 (3): 191 - 7.

25. Chen P, Kuo C, Pan C, Chou M. Risk of oral cancer associated with human papillomavirus infection, betel, quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiological study of 58 cases. *Taiwan J. Oral Pathol Med* 2002; 31 (6): 317 - 22.
26. Bu J, Pang J, Bu R. Study on the role of human papillomavirus in carcinogenesis of oral papillomas by in situ hybridization. *China Zhonghua Koa Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001; 36 (1): 34 - 6.
27. Soares C, Malavazi I, Dos Reis R, Neves KA. Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions. *Araraquara, SP Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35 (5): 439 - 44.
28. Shima K, Kobayashi I, Saito I, Kiyoshima T. Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38 (5): 445 - 50.
29. Mineta H, Ogino T, Amano H, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Japan Anticancer Res.* 1998; 18 (6B): 4765 - 8.
30. Minawaer Ahmatjan A, Suzuk L. Detection of HPV type 16, 18 infection and p53 protein overexpression in oral squamous cell carcinoma. *China Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001; 36 (6): 451 - 3.
31. Lubbe J, Kormann A, Adams V, Hassam S, Gratz K, Panizzon R, Burg G. HPV-11- and HPV-16- associated oral verrucous carcinoma. *Dermatology, Zurich, Switzerland* 1996; 192 (3): 217 - 21.
32. Ward K, Napier S, Winter P, Maw R, Dinsmore W. Detecction of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. *Belfast, U.K. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995; 80 (1): 63 - 6.
33. Shroyer K, Greer R, Fakhouser C. Detection of human papillomavirus DNA in oral verrucous carcinoma by polymerase chain reaction. *Denver Mod. Pathol.* 1993; 6 (6): 669 - 72.
34. Koppikar P, Devilliers E M, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumor of the oral cavity in an Indian community *Int J Cancer* (published online 2004), 2005; 113 (6): 946 - 950.
35. Smith E M, Ritchie J M, Summersgill K F, Hoffman H T, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (6): 449 - 455.
36. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Nat Cancer Inst.* 2003; 95 (23): 1772 - 1783.
37. Schwartz S M, Daling J R, Doody D R, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Nation Cancer Institut,* 1998; 90, (21): 1626 - 1636.
38. Smith E M, Ritchie J M, Summersgill K F, Klusmann J P, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; 108 (5), 766 - 72.
39. Campini G, Giovannelli L, Arico P, et al HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 2004; 98, (6): 705 - 711.