

Infección por papiloma virus humano y carcinoma escamocelular bucal, diversas técnicas moleculares para detectar su presencia

Human papillomavirus infection. Relationship with oral squamous cancer, several techniques for detecting its presence

Martínez Martínez A*, Baldiris Ávila R**, Díaz Caballero A***

RESUMEN

El cáncer bucal (CB) es una neoplasia maligna de comportamiento agresivo, que comprende el 4 al 5 % de todos los tumores, con una alta tasa de mortalidad, la gran mayoría son carcinomas escamocelulares (90%). Entre los factores de riesgo asociados al CB se describen el tabaquismo, predisposición genética, alcohol y últimamente se menciona algunos virus con el virus de papiloma humano (VPH) entre otros. El objetivo del presente artículo es revisar los reportes de literatura que dan cuenta de la relación que existe entre CB y VPH, específicamente se describe el comportamiento molecular de los VPH de alto riesgo, el mapa genómico del virus y su posible relación con CB. La evidencia científica muestra que entre el 15 al 30% de los CB están relacionados con HPV, específicamente el subtipo 16 considerado de alto riesgo oncogénico y que los individuos con presencia de VPH bucal tienen dos veces mayor riesgo de desarrollar un CB que aquel que no está expuesto al virus.

Palabras clave: Papillomavirus humano 6, carcinoma de células escamosas, transformación celular neoplásica (Decs Bireme).

SUMMARY

Oral cancer (BC) is an aggressive malignancy that includes 4 to 5% of all tumors with a high mortality rate, the vast majority are squamous cell carcinomas (90%). Among the factors risk associated with CB are described smoking, genetic predisposition, alcohol and recently mentioned some virus papilloma virus (HPV) among others. The aim of this paper is to review literature reports that account for the relationship between CB and HPV, specifically describing the molecular behavior of HPV high risk, the genome map of the virus and its possible relationship with CB. The Scientific evidence shows that between 15 to 30% of CB are related to HPV, specifically the subtype 16 considered high risk oncogenic and that individuals with oral HPV presence are twice increased risk of developing a CB who is not exposed to the virus.

Key words: Human Papilloma Virus, carcinoma squamous cell, Neoplastic transformation (Mesh Database).

* Odontólogo, Universidad de Cartagena. Especialista en Estomatología y Cirugía Oral. Universidad de Cartagena. Docente Universidad de Cartagena.

** Química Farmacéutica, Universidad de Cartagena. Magíster en Microbiología, Universidad de Cartagena. Docente Universidad de Cartagena. Grupo de investigaciones GINUMED.

*** Odontólogo, Universidad de Cartagena. Especialista en Periodoncia, Universidad Javeriana. Magíster en Educación, Universidad del Norte. Profesor Titular Universidad de Cartagena. Director Grupo de Investigaciones GITOUC.

Fecha de recepción: 26 de enero 2012.

Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2012.

Martínez Martínez A, Baldiris Ávila R, Díaz Caballero A. Infección por papiloma virus humano y carcinoma escamocelular bucal, diversas técnicas moleculares para detectar su presencia. *Av. Odontoestomatol* 2014; 30 (2): 69-78.

INTRODUCCIÓN

El cáncer bucal (CB) es una neoplasia maligna de comportamiento agresivo, que comprende el 4 al 5 % de todos los tumores que afectan al ser humano y se convirtió en un grave problema de salud a nivel mundial debido, al aumento de su incidencia en los últimos años, a su alta tasa de mortalidad y a la aparición en edades más tempranas del tumor, lo que conlleva a que la expectativa de sobrevivida de los pacientes con cáncer bucal se reduzca drásticamente. La mayoría de los CB, son del tipo carcinoma escamocelular bucal (CEB), lo que representa más del 90% de todos los cánceres bucales. Normalmente esta afección maligna se encuentra precedida por lesiones preexistentes, denominadas como alteraciones potencialmente malignas de la mucosa (1, 2). Afecta principalmente a personas de edad avanzada, mayores de 40 años, sin desconocer que existen diagnósticos cada vez más frecuentes, en pacientes entre 30 y 40 años, con una mayor presentación en los hombres (3, 4).

En Colombia, el cáncer es la tercera causa de muerte y el carcinoma escamocelular bucal (CEB) ocupa el quinto lugar entre todos los cánceres, con una relación hombre/mujer 2:1. Anualmente se presentan aproximadamente 2.000 nuevos casos de cáncer oral, en su mayoría diagnosticados en población mayor de 60 años y raramente en población menor de 40 años; comúnmente se encuentra asociado a factores de riesgo como el tabaco (5), predisposición genética (6) y el consumo de alcohol (7), sin embargo, hay factores de riesgo que cada vez se encuentran más relacionados con la aparición de la neoplasia bucal, es el caso de afecciones virales producidas por el Papiloma virus humano (VPH) (8), especialmente los subtipos considerados de alto riesgo tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 (8-10).

El virus papiloma humano (VPH) es un virus desnudo, tiene unos 55 nm de diámetro, un núcleo de ADN de doble cadena circular, pertenece a la familia de Papilomaviridae (11). Este genoma está conformado por 7.200 a 8.000 pares de bases con un peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Daltons (12), cubierto por una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que envuelven el genoma (13). Constituye un grupo viral heterogéneo que posee gran afinidad por los epitelios, es capaz de producir lesiones hiperplasias, papilomatosas y verrugosas tanto en piel como en mucosa, y en los últimos años se demuestra que juega un importante papel en la carcinogénesis (14, 15). La vía sexual, es la más común para su contagio (16, 17), es por esto que la infección por VPH es considerada la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo. Algunos autores consideran que en adultos la principal vía de transmisión es el sexo oral y los mecanismos de transmisión del tracto genital a la mucosa oral están completamente esclarecidos (18, 19).

La presencia del virus del papiloma humano en la cavidad bucal ha sido clasificada en dos grandes grupos: lesiones benignas y lesiones premalignas o malignas. Entre las lesiones bucales benignas se incluyen el papiloma bucal, verruga vulgar bucal, condiloma acuminado bucal e hiperplasia epitelial focal (también llamada enfermedad de Heck) (20), las lesiones premalignas o malignas incluyen la leucoplasia y el carcinoma escamocelular (21, 22).

En la actualidad, los aislados o cepas de VPH son clasificados atendiendo la homología de sus secuencias. 16 genotipos causantes de lesiones bucales fueron descritos de los 120 encontrados en humanos, como son los genotipos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 y 57; de estos el 13 y 32 son exclusivos de la cavidad bucal (10, 23, 24). La

mayoría de esos virus son de bajo riesgo (no oncogénicos) asociados a lesiones papilomatosas benignas: el 6 y 11 están asociados a papiloma bucal, 6 y 4 a verruga vulgar, 11 al condiloma acuminado, 13 y 32 a la hiperplasia epitelial focal, y tienen bajo potencial de progresión maligna (25-27).

En contraste, las lesiones orales malignas son asociadas con los genotipos de alto riesgo (oncogénicos) como el 16, 18, 31, 33 y 35 que están asociados con leucoplasia y carcinoma escamocelular al igual que los genotipos 39, 42, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 (28, 29).

El rol del VPH oncogénico es bien descrito en el cáncer de cérvix, no siendo así en el cáncer bucal. Recientes evidencias soportan la relación de genotipos VPH de alto riesgo, especialmente el subtipo 16 en la patogénesis del CEB (30, 31). Kreimer y col, reportaron que el ADN de VPH oncogénicos se detectó en aproximadamente el 26% de todos los carcinomas escamocelulares bucales (32). Miller y Johnstone 2001 determinaron que la prevalencia de VPH en este tipo de cáncer es de 46,7% (21, 33).

ETIOPATOGENIA VPH ALTO RIESGO

El modelo de infección por VPH de alto riesgo en cáncer de cérvix es bien descrito en diferentes artículos, este modelo puede ser tomado como base para comprender la etiopatogenia de la infección de alto riesgo en mucosa oral (34).

Si se esquematiza el mapa genómico del VPH 16, este presenta una estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región de control largo (LCR) y ocho regiones de lectura abierta (ORF) (35, 36).

Está confirmado que durante la actividad sexual, el micro trauma del epitelio genital en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxiterminal (37, 38).

Este receptor puede asociarse con Heparán Sulfato para los tipos virales 16-33 y con Alfa-6-Integrina para VPH 6 (8, 22). Una vez unido el virus a la superficie celular, éste ingresa al citoplasma de la célula huésped por endocitosis (22, 39).

Posterior a la endocitosis la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, por un proceso de reducción química que destruye los puentes disulfuros que estabilizan la cápside, dando origen a capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo con fragmentos del ADN viral, que atraviesan los poros del núcleo de la célula huésped permitiendo que el genoma viral y las proteínas de la cápside participen en los procesos de transcripción, replicación del ADN y maduración de viriones (40, 41).

Este proceso de integración genómica permite la expresión desregulada de E6 y E7, se pierde la función reguladora de E2 y se generan replicas de células epiteliales con ADN viral de alto riesgo integrado en su núcleo. Estas células se siguen replicando de manera desregulada, lo que lleva a la formación de una lesión neoplásica maligna de origen epitelial (26, 42).

En el caso del VPH de bajo riesgo, no se produce integración genómica del ADN viral con la célula huésped, durante la replicación celular el resultado clínico es una lesión verrugosa benigna (18, 43).

En el estrato basal, se puede mantener la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extra cromosómica, llamados episomas (44-46). En esta etapa, el ADN viral se distribuye difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune (26, 47, 48), esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva (49).

En el caso del carcinoma escamoso celular, el mecanismo de infección del VPH es iniciada y mantenida por las oncoproteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo (50), las cuales inducen desregulación de los mecanismos de control del ciclo celular, produciendo inestabilidad genómica (50, 51). Ambas

oncoproteínas promueven la degradación del producto de genes supresores de tumores, la E6 modifica el gen p53, mientras la E7 modifica el pRB, inhibiendo la actividad del factor de crecimiento tumoral TGF - β 2 (19), los cuales participan en el punto de control de la fase G1 del ciclo celular. De esta forma las células son más propensas a dividirse y a producir mutaciones que causan malignidad (52, 53).

En Colombia, la incidencia y prevalencia de la infección es cada vez más alta (54), de allí la necesidad de resaltar la importancia de realizar un diagnóstico precoz en pacientes con lesiones benignas en boca, lo cual permitiría un tratamiento preventivo adecuado, evitando su transformación y progresión a lesiones premalignas y/o malignas (55).

MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE VPH

Existen diferentes métodos moleculares de detección del virus papiloma humano (HPV) de alto riesgo. Estos van desde la hibridación *in situ*, el Southern Blot hasta métodos más sensibles y usados actualmente como son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el test de captura Híbrida II (HC-II), entre otros (56, 57). A continuación son descritos los métodos de mayor importancia en el diagnóstico de este agente viral.

La detección de la infección por el VPH humano en muestras orales incluye: la detección del DNA del VPH en especímenes orales y en biopsias, técnicas inmunohistoquímicas para detectar marcadores moleculares relacionadas tales como p53, ciclina D1 y p16, además de la identificación de anticuerpos E6, E7 y proteínas en suero que indican respuesta inmune al virus (58-60).

Los anticuerpos en suero son usados como marcadores de exposición acumulativa a VPH. Numerosos estudios de seroprevalencia demuestran fuertes asociaciones entre anticuerpos de VPH en suero y cáncer oral (61, 62). Aunque en este tipo de estudio la desventaja está reflejada en que el VPH es específico al sitio mucoso y a la disminución de los anticuerpos con el tiempo (8, 63). La técnica usada en esos ca-

sos es ELISA. No obstante, la seropositividad puede ser un factor de confusión asociado con otros factores de riesgo para cáncer oral, incluyendo la exposición al tabaco y el etanol (64).

Al utilizar biomarcadores de DNA para la identificación del VPH, el DNA puede ser aislado a partir de células exfoliadas orales obtenidas directamente con un guisopo o colectadas de saliva, sin embargo, no está estandarizada la recolección de las células usando enjuagues orales (6, 65).

Este DNA aislado es posteriormente amplificado utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente visualizado por electroforesis de ADN (66). Su fundamento consiste en aplicar un proceso que multiplica el número de copias de un segmento de DNA viral, si está presente en la muestra. Este proceso se conoce como *amplificación*, la PCR es una técnica muy sensible, capaz de detectar la presencia de muy pocas copias de DNA del virus, esta gran sensibilidad que es su gran virtud es también su principal debilidad, puesto que detectan un número elevado de pacientes con infecciones no progresivas o infección latente sin alteraciones histopatológicas, que probablemente se resuelvan en gran parte de forma espontánea (67).

Las técnicas basadas en la PCR tampoco permiten cuantificar adecuadamente el DNA viral presente en la muestra. Por otro lado, debe contarse con sondas complementarias para cada uno de los tipos de HPV que se desee identificar, los primers universales y específicos han sido diseñados para la detección de la región L1, E1, E6 y E7 del virus (68, 69). Otro de sus problemas es la elevada probabilidad de contaminaciones y falsos positivos (70).

Variantes de esta técnica permiten perfeccionar el diagnóstico de VPH, dentro de estas se encuentra: PCR acoplada a RFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción) la cual utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios específicos (71), PCR anidada (67) y la PCR cuantitativa donde sondas fluorescentes son clivadas por la amplificación de la ADN polimerasa y el grado de fluorescencia es medida para cuantificar el virus presente (29, 72).

Otra técnica que involucra el aislamiento del DNA del VPH es la hibridación *in situ* (HIS) (73). Esta consiste en detectar clones específicos que contengan un gen ADN o ARN de interés, usando sondas de oligonucleótidos complementarias a secuencias del VPH, que detectan el ácido nucleico, primero se desnaturaliza el ADN calentando el mismo en una solución salina, el ADN simple resultante se coloca en un filtro de nitrocelulosa o membrana de nylon tratada, para luego incubarla en una solución que contiene la sonda marcada radioactivamente, esta sonda se *hibrida* a cualquier hebra de ácido nucleico fijada a la membrana, finalmente los excesos de sonda no hibridada se eliminan con lavado y los híbridos marcados se detectan mediante auto radiografía del filtro (74).

El Southern blot es uno de los gold standard para la detección del DNA del VPH, ofrece la habilidad de distinguir entre DNA episomal y DNA integrado y puede detectar hasta 0,1 por célula (68). En contraste con las técnicas anteriores que muestran esta desventaja, sin embargo, aunque utilice poca cantidad de DNA y sea altamente específica, varios autores reportan menos sensibilidad que al usar la PCR con primers específicos (75). Esta técnica permite detectar la presencia de una secuencia de ADN en una mezcla compleja de este ácido nucleico. Para ello, emplea la técnica de electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar en base a la longitud de los fragmentos de ADN y, después, una transferencia a una membrana en la cual se efectúa la hibridación de la sonda. En esta técnica se utilizan sondas del virus de VPH marcadas con isótopos de fósforo (^{32}P). Puede usarse como muestras especímenes orales y biopsias embebidas en parafina (76, 77).

Otros métodos inmunoquimioluminiscentes también fueron desarrollados y se reportan que son muy sensibles y específicos, tales como el test de captura Híbrida II (HC-II) (78), el cual utiliza el siguiente protocolo: primero se desnaturaliza el ADN de hebra doble para ser convertido en ADN de hebra simple, este proceso consiste en calentar el mismo en una solución diluida fuertemente alcalina que abre la cadena doble, luego el ADN de hebra simple es hibridado en una solución de sondas de ARN HPV 13 de alto riesgo (79). El híbrido ADN-ARN resultan-

te es capturado en un filtro cubierto con anticuerpos específicos de ADN-ARN, estos híbridos son reaccionados con anticuerpos conjugados de fosfatasa alcalina y detectados mediante una reacción tipo ELISA por quimioluminiscencia, la luz emitida se mide con una unidad relativa de luz (RLU) en un luminómetro (79). En esta técnica se utilizan sondas de ARN capaces de detectar varios tipos de HPV. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido ADN-ARN que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante quimioluminiscencia, la técnica permite incluso obtener información sobre la cantidad de ADN viral presente en la muestra, lo que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado (80).

La detección de HPV de alto riesgo mediante captura Híbrida II es de mucha utilidad puesto que esta técnica tiene un alto valor predictivo negativo, por lo tanto su negatividad permite excluir con un elevado grado de certeza la existencia de una lesión premaligna de alto grado y prácticamente descarta la existencia de lesiones bucales causadas por HPV (81).

Por último, la captura Híbrida proporciona una cuantificación de HPV en relación con los niveles de unidades lumínicas relativas (RLU), en la medida que estas aumenten hay un incremento progresivo de carga viral paralelo a la gravedad de la lesión. Niveles superiores a 100 RLU se asocian a lesión clínica en más del 90% de los casos y en niveles superiores a 1.000 RLU la presencia de lesiones clínicas fue constante, por el contrario determinaciones inferiores a las 10 RLU, no presentan lesiones (82).

Para concluir se puede establecer que la diversidad de técnicas moleculares con las que se cuenta en la actualidad, con el mejoramiento y refinamiento de diversos procesos de laboratorio, hacen de manera inevitable que los diagnósticos en la cavidad oral, sean mucho más precisos, inclusive desde el punto de vista molecular y proteómico, para poder establecer de forma mucho más exacta, la presencia de los virus del papiloma en humanos y su posible relación con la aparición de carcinomas en la cavidad oral, predecir su comportamiento e intentar buscar posibles alternativas terapéuticas modernas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brockstein BE. Management of recurrent head and neck cancer: recent progress and future directions. *Drugs*. 2011 Aug 20;71(12):1551-9.
2. Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oropharyngeal cancer incidence trends: diminishing racial disparities. *Cancer Causes Control*. 2011 May;22(5):753-63.
3. Callaway C. Rethinking the head and neck cancer population: the human papillomavirus association. *Clin J Oncol Nurs*. 2011 Apr;15(2):165-70.
4. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, Gonzalez P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*. 2010 Jun;37(6):386-91.
5. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011 Aug;47(8):725-31.
6. Pathare SM, Gerstung M, Beerenwinkel N, Schaffer AA, Kannan S, Pai P, et al. Clinicopathological and prognostic implications of genetic alterations in oral cancers. *Oncol Lett*. 2011 May;2(3):445-51.
7. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control*. 2010 Sep;21(9):1369-78.
8. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: A meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol*. 2011 Aug 2.
9. Kulkarni SS, Vastrad PP, Kulkarni BB, Markande AR, Kadakol GS, Hiremath SV, et al. Prevalence and distribution of high risk human papillomavirus (HPV) Types 16 and 18 in Carcinoma of cervix, saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and in the general population in Karnataka, India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(3):645-8.
10. Rautava J, Syrjanen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *J Am Dent Assoc*. 2011 Aug;142(8):905-14.
11. Tugizov SM, Webster-Cyriaque JY, Syrianen S, Chattopadhyay A, Sroussi H, Zhang L, et al. Mechanisms of viral infections associated with HIV: workshop 2B. *Adv Dent Res*. 2011 Apr; 23(1):130-6.
12. Lilly EA, Cameron JE, Shetty KV, Leigh JE, Hager S, McNulty KM, et al. Lack of evidence for local immune activity in oral hairy leukoplakia and oral wart lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Jun; 20(3):154-62.
13. Schulz E, Gottschling M, Wibbelt G, Stockfleth E, Nindl I. Isolation and genomic characterization of the first Norway rat (*Rattus norvegicus*) papillomavirus and its phylogenetic position within Pipapillomavirus, primarily infecting rodents. *J Gen Virol*. 2009 Nov;90(Pt 11):2609-14.
14. Guerrero-Preston R, Baez A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M. Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *P R Health Sci J*. 2009 Mar;28(1):24-9.
15. Bologna-Molina RE, Castaneda-Castaneira RE, Molina-Frechero N, Perez-Rodriguez E. Human papilloma virus and its association with oral cancer. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2006 Mar-Apr;44(2):147-53.
16. Mechl Z, Neuwirthova J, Brancikova D. A growing problem-human papillomavirus and head and neck cancers. *Vnitr Lek*. 2011 Mar;57(3):288-92.
17. Tinoco JA, Silva AF, Oliveira CA, Rapoport A, Fava AS, Souza RP. Human papillomavirus (HPV) infection and its relation with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. *Rev Assoc Med Bras*. 2004 Jul-Sep;50(3):252-6.

18. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Marnewick JC, Meyerov R, Lemmer J. HPV-associated oral warts. *SADJ*. 2011 Mar;66(2):82-5.
19. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med*. 2010;6:14.
20. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Malema V, Meyerov R, Lemmer J. Focal epithelial hyperplasia (Heck disease) related to highly active antiretroviral therapy in an HIV-seropositive child. A report of a case, and a review of the literature. *SADJ*. 2010 May;65(4):172-5.
21. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jul;82(1):57-68.
22. Naidu A, Wright JM. The role of the human papillomavirus in oropharyngeal cancer. *Tex Dent J*. 2011 May;128(5):447-54.
23. Syrjanen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):494-509.
24. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):291-307.
25. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:16.
26. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Chikte UM, Meyerov R, Lemmer J. HPV modulation of host immune responses. *SADJ*. 2010 Jul;65(6):266-8.
27. Migaldi M, Pecorari M, Forbicini G, Nanni N, Grottola A, Grandi T, et al. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med*. 2011 Jul:18.
28. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther*. 2009 Apr-Jun;5(2):71-7.
29. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*. 2000 Jun;13(6):644-53.
30. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med*. 2010; 6:15.
31. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*. 2003 Apr 10;104(3):336-44.
32. Kreimer AR. Oral sexual behaviors and the prevalence of oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*. 2009 May 1;199(9):1253-4.
33. Miller CS. Herpes simplex virus and human papillomavirus infections of the oral cavity. *Semin Dermatol*. 1994 Jun;13(2):108-17.
34. Fakhry C, Rosenthal B, Clark DP, Gillison ML. Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal "Pap-test equivalent" in high-risk populations. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Aug 11.
35. Van Ranst M, Fuse A, Fiten P, Beuken E, Pfister H, Burk RD, et al. Human papillomavirus type 13 and pygmy chimpanzee papillomavirus type 1: comparison of the genome organizations. *Virology*. 1992 Oct;190(2):587-96.

36. Llamas-Martinez S, Esparza-Gomez G, Campo-Trapero J, Cancela-Rodriguez P, Bascones-Martinez A, Moreno-Lopez LA, et al. Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec;28(6A):3733-41.
37. Alvarez Alvarez I, Sanchez Lazo P, Ramos Gonzalez S, Rodrigo Tapia JP, Nunez Batalla F, Suarez Nieto C. Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 1997 Nov-Dec;18(6):375-81.
38. Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health.* 2010 Apr;46(4 Suppl):S12-9.
39. Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol.* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii243-5.
40. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
41. Fujita S, Senba M, Kumatori A, Hayashi T, Ikeda T, Toriyama K. Human papillomavirus infection in oral verrucous carcinoma: genotyping analysis and inverse correlation with p53 expression. *Pathobiology.* 2008;75(4):257-64.
42. Aswini YB. The genomics of oral cancer and wound healing. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2009 Jan-Mar;27(1):2-5.
43. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J, et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virol J.* 2010;7:194.
44. Cheah PL, Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol.* 1998 Jun;20(1):1-10.
45. Reshmi SC, Huang X, Schoppy DW, Black RC, Saunders WS, Smith DI, et al. Relationship between FRA11F and 11q13 gene amplification in oral cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Feb;46(2):143-54.
46. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res.* 2006;19(1):99-105.
47. Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi SS, et al. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep.* 2007 Apr;17(4):931-9.
48. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene.* 2008 Dec;27 Suppl 2:S31-42.
49. Brabin L. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. *AIDS Patient Care STDS.* 2002 May;16(5):211-21.
50. Yasmeeen A, Bismar TA, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, et al. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2007 Dec 1;6(23):2939-43.
51. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol.* 2007 Apr;30(4):813-23.
52. Dynan W, Takeda Y, Roth D, Bao G. Understanding and re-engineering nucleoprotein machines to cure human disease. *Nanomedicine (Lond).* 2008 Feb;3(1):93-105.
53. Shin KH, Kang MK, Kim RH, Kameta A, Baluda MA, Park NH. Abnormal DNA end-joining activity in human head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 2006 May;17(5):917-24.
54. Sierra-Torres CH, Acosta-Aragon MP, Orejuela-Aristizabal L. Papillomavirus and factors associated with high-risk, cervical intraepithelial neoplasia in Cauca, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2006 May;8 Suppl 1:47-58.

55. Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002 Jul 29;87(3):324-33.
56. Mitsouras K, Faulhaber EA, Hui G, Joslin JO, Eng C, Barr MC, et al. Development of a PCR Assay to detect Papillomavirus Infection in the Snow Leopard. *BMC Vet Res*. 2011;7:38.
57. Jarboe EA, Willis M, Bentz B, Buchmann L, Hunt J, Ellis G, et al. Detection of human papillomavirus using hybrid capture 2 in oral brushings from patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2011 May;135(5):766-9.
58. Lee TY, Kim YH, Lee KS, Kim JK, Lee IH, Yang JM, et al. Human papillomavirus type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57BL/6 mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Nov;59(11):1727-37.
59. Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsague X, Snijders PJ, Pawlita M, et al. Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer Res*. 2004 Jan 15;64(2):468-71.
60. Itakura M, Mori S, Park NH, Bonavida B. Both HPV and carcinogen contribute to the development of resistance to apoptosis during oral carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2000 Mar;16 (3):591-7.
61. Zheng S, Vuitton L, Sheyhidin I, Vuitton DA, Zhang Y, Lu X. Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part one: behavioural and environmental risk factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Aug;22(8):917-25.
62. Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2007 Feb 15;120 (4):825-32.
63. Sink J, Kademani D. Maxillofacial oncology at the University of Minnesota: treating the epidemic of oral cancer. *Northwest Dent*. 2011 May-Jun;90 (3):13-6, 38.
64. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(4):188-96.
65. Bosch FX. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Jul 15.
66. Nuovo GJ. In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol Biol*. 2011;688:35-46.
67. Angiero F, Gatta LB, Seramondi R, Berenzi A, Benetti A, Magistro S, et al. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res*. 2010 Sep;30(9):3435-40.
68. Sand L, Jalouli J, Larsson PA, Magnusson B, Hirsch JM. Presence of human papilloma viruses in intraosseous ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Oct;58(10):1129-34; discussion 35-6.
69. SahebJamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashimoghadam F, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Oct;14(10):e525-8.
70. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas—commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med*. 2006 Feb;35(2):86-90.
71. Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods*. 2002 Aug;105(1):159-70.
72. Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human

- papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1203-9.
73. Courtade M, Brousset P, Delsol M, Gorguet B, Viraben R, Voigt JJ, et al. Simultaneous detection by non-isotopic in situ hybridization of human papilloma viruses and Epstein-Barr virus during the lytic cycle in oral hairy leukoplakia lesions. *Ann Pathol.* 1992;12(6):353-7.
74. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reynies A, Rickman D, Thomas E, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010 Apr 15;126(8):1882-94.
75. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med.* 2006 Jul;35(6):338-44.
76. Acha-Sagredo A, Ruesga MT, Aguirregaviria JI, Aguirre-Urizar JM. HPV infection and oral carcinogenesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jan;15(1):e1-2.
77. Snietura M, Piglowski W, Jaworska M, Mucha-Malecka A, Wozniak G, Lange D, et al. Impact of HPV infection on the clinical outcome of p-CAIR trial in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011 May;268(5):721-6.
78. Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Singh M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Virology.* 2010;7:253.
79. Ozturk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay]. *Mikrobiyol Bul.* 2004 Jul;38(3):223-32.
80. Saini R, Khim TP, Rahman SA, Ismail M, Tang TH. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. *Virology.* 2010;7:131.
81. Li C, Wu M, Wang J, Zhang S, Zhu L, Pan J, et al. A population-based study on the risks of cervical lesion and human papillomavirus infection among women in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Oct;19(10):2655-64.
82. Kulmala SM, Syrjanen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Podistov J, et al. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2470-5.

CORRESPONDENCIA

Adel Martínez Martínez
Campus de la Salud Zaragocilla
Cartagena de Indias, Bolívar.
Colombia.

Correos electrónicos: adelmartinez@hotmail.com,
adiacz1@unicartagena.edu.co