

DETERMINACIÓN DEL VPH EN CAVIDAD ORAL POR TÉCNICA DEL HISOPO

GABY RUIZ, PEDRO OJEDA, LORETTA DI GIAMPIETRO

HOSPITAL ONCOLÓGICO "PADRE MACHADO", SERVICIO DE CIRUGÍA HOSPITAL RICARDO BAQUERO GONZÁLEZ, CARACAS, VENEZUELA

RESUMEN

OBJETIVO: En este estudio nos proponemos determinar la presencia del VPH en cavidad oral por técnica de hisopado. **MÉTODOS:** Se utilizó una muestra de 85 pacientes que por medio de exámenes clínicos y cito-histopatológico se determinó la presencia de la infección por VPH en extendidos de Papanicolaou en la cavidad bucal a través de tomas de hisopado faríngeo. **RESULTADOS:** De los 85 pacientes estudiados, 49 eran de sexo femenino y 36 masculinos. En el diagnóstico microscópico 7 pacientes resultaron positivos para VPH de los cuales eran 6 mujeres (6 %) y 1 hombre (1 %). **CONCLUSIONES:** La mayor presencia del VPH en nuestro estudio por sexo fue en el femenino con un 6 %, siendo pacientes que presentaban más de 3 a 5 parejas por año, ubicándose entre los 23 y 48 años de edad en la población estudiada, de los cuales el 100 % de ellos refirió inicio precoz de relaciones sexuales antes de los 20 años. La aplicación del tratamiento estadístico de Alfa de Crombach reportó un 71 % de significancia, concluyendo que la técnica de determinación de VPH por hisopado es un examen fácil, manejo rápido, económico y que puede ser empleado como protocolo para la determinación precoz de lesiones en cavidad oral y su correlación con VPH genital. Esta técnica se podría incluir como método de pesquisa en población a riesgo a infección de VPH y por ende hacer diagnóstico en etapas premalignas de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, cérvix, virus papiloma humano, cavidad oral, Papanicolaou.

SUMMARY

OBJECTIVE: The objective of this study is to determine the presence of the HPV in oral cavity by hyssop technique. **METHODS:** We used a sample of 85 patients who by means of clinical examinations and cytology pathology determined the presence of the infection by HVP in extended of Papanicolaou in the oral cavity through takings of hyssop pharyngeal. **RESULTS:** Of the 85 studied patients, 49 were of feminine sex and 36 masculine ones. In the microscopic diagnosis 7 patients were positive for HVP from which they were 6 women (6 %) and 1 man (1 %). **CONCLUSIONS:** The greater presence of the HVP in our study by sex was in the feminine one with a 6 %, being patient that presented of 3 to 5 pairs per year, being located enters the 23 and 48 years of age in the studied population, of which the 100 % of them referred precocious beginning of sexual relations before the 20 years, the application of the statistical treatment of Alpha of Crombach reported a 71 % of significance, concluding that the technique of hyssop determination of HVP is an easy examination handling, express, economic and that can be used as a protocol for the precocious determination of injuries in oral cavity and its correlation with genital VPH. This technique could be included as method of screening program to VPH infection and therefore at risk be made diagnosis in premalignant stages of the disease.

KEY WORDS: Cancer, cervix, human papillomavirus, oral cavity, Papanicolaou.

INTRODUCCIÓN

E

l virus papiloma humano (VPH) pertenece a un grupo de virus cuyo genoma y ADN, tienen las características biológicas particulares de los epiteliotrópicos,

Recibido:22/07/2008 Revisado:29/12/2008

Aceptado para publicación:05/01/2009

Correspondencia: Dra. Loretta Di Giampietro.

Hospital Oncológico "Padre Machado" Calle Alejandro Calvo L, Urb. Los Castaños, el Cementerio Caracas, Venezuela. Telf: 212-6310136. Email: ldigiampietro@cantv.net

se caracterizan por una inusual historia natural de infección subclínica con consecuencias serias⁽¹⁻³⁾. Los 3 virus de papiloma (UP) son miembros de la familia viral paposvaviridae los cuales son considerados como firmas viales sobre la base de su habilidad para inmortalizar las células normales. Esta familia incluye el virus del polio, el virus del papiloma *shope*, virus del mono vacuolado y los virus de verrugas humanos, ganados, perro, caballo, cabras, cerdos y otras especies, que causan infecciones, y pueden estar latentes en su hospedaje natural.

Los virus son clasificados de acuerdo al hospedaje natural y en relación con sus ácidos nucleicos, así tenemos: VPH, (virus papiloma bovino (VPB) y CTT; los virus aislados de las mismas especies son subclasificados en tipos de acuerdo a la homología de su secuencia de ácidos nucleicos, a través de técnicas de fragmentación con endonucleasas y de hibridación molecular.

Cualquiera que se aísle y presente menos de 50 % de homología con la ya existente es designado como un nuevo tipo y se le da un número de acuerdo al orden que le corresponde, si la homología es más alta del 50 % son considerados como subtipos, y si ésta es cercana al 100 % con sólo pocas diferencias en las secuencias de nucleótidos son considerados como variante del mismo tipo viral⁽²⁻²²⁾.

El VPH presenta más de 200 tipos bien definidos; entre ellos hay tipos que comúnmente se relacionan con lesiones benignas y otros bien reconocidos que implican un alto grado de transformación maligna^(3,4). Los tipos diferentes comparten menos del 90 % de sus secuencias de ADN en L1.3, los VPH son específicos de especie y los tipos concretos se asocian a manifestaciones clínicas propias. Reguéis⁽²³⁾ menciona especificidad de sitio de tejido o latencia del VPH en algunas lesiones epiteliales bucales típicas de infección por VPH.

Además los diferentes tipos de VPH no sólo se diferencian por la morfología de las lesiones que producen, sino también por su posible potencial

oncogénico. Es por ello que se los ha clasificado en tres grupos de acuerdo a estas características y al tipo de lesión que producen. Varios autores los agrupan en los de mayor riesgo VPH tipos 16 y 18, los de riesgo intermedio VPH tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51 y 52 y los de menor riesgo los tipos 6, 11, 42 y otros.

El papel que juegan determinados tipos de dichos virus en la oncogénesis está bien establecido en las lesiones genitales, no así en otras localizaciones, como la cavidad bucal⁽⁶⁻¹²⁾. Es por ello que surge el interés por identificar en lesiones bucales malignas cual o cuales de estos tipos de virus son los más frecuentemente implicados.

En otro estudio llevado a cabo en la India⁽⁷⁾ se encontró que el 70 % de los pacientes evaluados presentaban infección por VPH de alto riesgo tipo 16 y 18, llegando a la conclusión que este virus juega un papel importante en la oncogénesis oral, representa el 30 % al 40 % de las enfermedades malignas en este país, en contraste con otros lugares del oriente en donde el cáncer relacionado con el virus representa el 3 % al 4 %.

Investigaciones epidemiológicas recientes han postulado la posibilidad de una conexión entre la infección viral por VPH y la existencia del carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal. La presencia viral ha sido detectada en lesiones precursoras utilizando técnicas de inmunohistoquímica (Peroxidasa-antiperoxidasa) entre otras^(6,7,9,10). Como también en neoplasias benignas y malignas de la cavidad bucal, en muchos trabajos realizados por numerosos grupos de investigadores⁽¹²⁻²⁵⁾.

Para el año 2001 se realizó un estudio en Canadá⁽⁹⁾ en el que se determinó que en el grupo etario comprendido entre los 0 y los 10 años de edad el 86 % de la muestra eran positivos al VPH, en relación con otros grupos etarios las firmas clínicas que predominaban eran las verrugas y papilomas laríngeos. De los virus aislados el 68 % eran de origen genital, observándose con más frecuencia el tipo 6 y 11.

En Venezuela la más alta prevalencia ⁽²²⁾ en infección por VPH fue reportada en un estudio sobre hiperplasia epitelial focal realizada en niños indígenas donde el virus fue aislado en un 38,8 % de los casos. El primer estudio realizado en nuestro país que identifica el tipo de VPH usando técnicas de biología molecular fue reportado en 1992 y 1993 y en él se evidencia el rol del virus en las lesiones bucales de las verrugas vulgares. El estudio se realizó en pacientes cuya edad oscilaba entre 5 y 37 años, en los cuales el 50 % de las lesiones estaban en paladar duro; la técnica empleada para aislarlos fue la hibridación *in situ* del ADN y el virus aislado fue el tipo 13.

Para el año 1998, también en Venezuela se hizo un estudio de prevalencia donde se detectó por técnica de biología molecular (PCP) los virus tipo 6, 11, 13, 16 y 32 en lesiones clínicamente benignas de la cavidad bucal. En este estudio el sexo femenino no resultó ser el más afectado y el rango de edad se ubicó entre la segunda y cuarta década para el papiloma bucal y la primera década para la hiperplasia epitelial focal ⁽²²⁾.

La relación causa efecto del VPH en el cáncer bucal todavía está siendo estudiada, pudiendo desempeñar un activo papel en su iniciación. Se han identificado virus de alto riesgo que codifican oncoproteínas que comprometen el crecimiento celular fisiológico a través de la unión con los productos de los genes supresores tumorales y posiblemente el efecto oncogénico de estos virus sea la consecuencia, al menos en parte, de estas interacciones. Se ha postulado también que pueden actuar sinérgicamente con otros factores como el tabaco y el alcohol, en el desarrollo de un carcinoma ⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de la infección que está relacionado con cambios en los hábitos sexuales y la mayor promiscuidad concomitante. En un estudio realizado en 1996 de esta enfermedad de transmisión sexual se reportó: que aproximadamente 2 de cada 3 personas que tienen contacto sexual con un compañero con

verrugas genitales desarrollan la enfermedad.

La presencia simultánea de infección por VPH en mucosa bucal y genital ha sido probada en 1998 en la Universidad de Roma, donde se realizó un estudio sobre 16 pacientes y se tomaron muestras de cavidad bucal, cuello uterino, área vulvar y vaginal éstas se sometieron a estudios con técnicas de PCR, los resultados mostraron la presencia simultánea de infección en mucosa genital y cavidad bucal en 9 pacientes, y se encontró constancia de tipo específico del VPH en 7 de los 16 pacientes, los investigadores concluyen, por esta concordancia parcial que no existe en algún paciente una transmisión directa desde la cavidad bucal al área genital o viceversa.

Algunos autores sugieren que los VPH de alto riesgo asociados a cánceres de vías aéreo digestivas superiores (VADS) ^(7,23), pueden ser similares pero no idénticos a los VPH asociados al cáncer de cérvix. Se conoce que algunos subtipos de VPH16 asociados a los carcinomas de cabeza y cuello tienen unas alteraciones características en la región del promotor/realizador que los hace particularmente activos en los queratinocitos orales. Existe una pequeña proporción de carcinomas escamosos de cabeza y cuello (15 % - 20 %) que ocurren en pacientes no fumadores ni bebedores, esto sugiere la presencia de otros factores de riesgo. Recientes datos epidemiológicos y moleculares sugieren que la infección del VPH de las VADS puede promover la génesis tumoral en cabeza y cuello ⁽²⁷⁻²⁹⁾.

MÉTODOS

El presente estudio se realizó siguiendo las normas de Vancouver con una metodología de investigación tipo descriptivo, prospectivo, longitudinal por medio de exámenes clínicos y cito-histopatológicos, se determinó la presencia de la infección por VPH en extendidos de Papanicolaou de la cavidad oral a través de tomas de hisopado faríngeo de la población adulta

estudiada, desde 01 de enero hasta 30 de agosto de 2007. El método estadístico utilizado en este trabajo fue la prueba de Alfa de Crombach para determinación de sensibilidad, especificidad, cálculo de modo, mediana y la desviación estándar por t de Student. En los casos positivos se utilizó la determinación de subtipo viral a través del PCR.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes femeninos y masculinos con edades entre 14 y 55 años sexualmente activos
- Pacientes con hábitos tabáquicos
- Pacientes con uso y abuso de alcohol
- Pacientes femeninas con citología positiva para VPH.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes femeninos y masculinos con edades menores a 14 años y mayores de 55 años
- Paciente sin vida sexual activa.

MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

En el presente trabajo utilizamos

1. Pacientes de la consulta externa del servicio de cirugía entre edades comprendidas entre 14 y 55 años, con vida sexual activa.
2. Kit de citología:
 - Hisopos
 - Lámina de portaobjeto
 - Fijador
 - Cuestionario

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Se dividió el procedimiento en tres fases

PRIMERA FASE

Se procedió al llenado del cuestionario con

recolección de datos antes de la toma de la muestra. Mediante el examen físico: inspección y palpación se descartaron patologías asociadas tales como infecciones orofaríngeas, adenopatías, sinusopatías, etc. Posteriormente se procedió a la toma de muestra ubicando al paciente sentado e indicándole la apertura bucal para la toma de muestra con hisopado en pilares amigdalinos, amígdalas, carinas, región sublingual. Se realiza extendido de la muestra en lámina portaobjeto con posterior fijación de la misma.

SEGUNDA FASE

Se obtienen resultados citohistológicos de las láminas enviadas los cuales son revisados, evaluados y discutidos por el mismo médico patólogo.

TERCERA FASE

Se realizó nueva toma de muestra por técnica de hisopado a pacientes con resultados positivos para VPH para la determinación del serotipo de virus. La técnica de diagnóstico que se utilizó es la de PCR.

A las muestras de hisopados se les realizó directamente la extracción de ADN con bromuro de cetil trimetilamonio, 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.

Se realizó documentación fotográfica.

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

RESULTADOS

Una vez recogidos los datos, se obtuvieron los siguientes resultados: la edad de los pacientes la

media fue de 35,20 años la mediana 33,50 y la moda de 40,25 años con una desviación estándar de 25,50 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución por edades de los pacientes

	Frecuencia	%
10-15	2	5
16-20	3	6
21-25	11	13
26-30	14	16
31-35	8	9
>36	47	55
Total	76	100

Fuente : Formulario aplicado a población consulta externa del HRBG.

En cuanto a los pacientes VPH positivos la media fue de 0,5 con una mediana de 3,5 una moda de 2 y una desviación estándar D: $\pm 1,5$.

Fueron estudiados 85 pacientes que durante el tiempo de recolección de datos cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales 49 eran de sexo femenino y 36 masculinos; de ellos, 16 eran menores de 25 años; 51 pacientes correspondían a edades comprendidas entre 25- 45 años y 18 eran mayores de 45 años.

Al examen microscópico el 100 % de los pacientes presentaron células epiteliales y linfocitos. En el diagnóstico microscópico 6 pacientes resultaron positivos para VPH de los cuales 5 eran mujeres y sólo uno varón.

Las manifestaciones de proceso inflamatorio de leve a moderado estaban presentes en 40 de los pacientes, 32 de los cuales manifestaron hábitos tabáquicos; 61 de los pacientes hábitos alcohólicos; 32 pacientes con enfermedades concomitantes entre las cuales están diabetes mellitus, hipertensión arterial, infección por HIV, y VPH entre otras; 6 de los pacientes encuestados manifestaron utilizar drogas ilícitas; 47 de los

pacientes presentaron inicio de la actividad sexual entre los 16-20 años; 26 pacientes se iniciaron entre los 10-15 años; 84 de los pacientes manifestaron ser de tendencia heterosexual, sólo 1 era homosexual.

Del total de pacientes, 61 manifestaron tener entre 1 y 3 parejas por año; 12 entre 3 y 5 y 12 de los pacientes manifestaron tener más de 5 parejas por año.

DISCUSIÓN

En relación con la edad y sexo, en el presente estudio el 58 % eran de sexo femenino, esto se correlaciona con la literatura mundial ⁽¹⁾ que está alrededor de 70 % - 80 %. El 9 % de esos pacientes tenían edades que oscilaban entre 36 y 40 años.

Al examen microscópico el 100 % de los pacientes presentaron células epiteliales y linfocitos. Sólo el 7 % de los pacientes estudiados fueron positivos para VPH. Siendo un 6 % mujeres y el 1 % hombres. Mientras que el 47 % presentaron manifestaciones de proceso inflamatorio de leve a moderado, que podría explicar el número de casos positivos encontrados en relación con la dificultad para el patólogo de visualizar el VPH en los extendidos citológicos ^(2, 7, 8).

El 38 % de los pacientes de nuestra serie manifestaron hábitos tabáquicos y el 72 % hábitos alcohólicos, de los cuales 38 % de los pacientes manifestaron sufrir de enfermedades concomitantes: hipertensión, diabetes, HIV, VPH que son factores establecidos para lesiones premalignas y cáncer oral. El 7 % de los pacientes encuestados manifestaron utilizar drogas ilícitas, un dato no evaluado en las publicaciones estudiadas ^(11-13,16).

El 55 % de los pacientes manifestaron el inicio de la actividad sexual entre los 16-20 años, correspondiendo el 100 % en este estudio, el 99 % de los pacientes manifestaron ser de tendencia

heterosexual, sólo el 1 % es homosexual. El 72 % de los pacientes manifestaron tener entre 1 y 3 parejas por año; 10 % (entre 3 y 5) parejas y 12 % de los pacientes manifestaron tener más de 5 parejas por año, esto se correlaciona con las estadísticas mundiales. Estos datos son esperados pues existe una correlación entre inicio precoz de relaciones sexuales, promiscuidad e infección por VPH ^(16,18,20).

La aplicación del tratamiento estadístico de Alfa de Crombach permitió calcular el índice de significancia del estudio de las variables planteadas, lo cual arrojó como resultado 0,71 esto se traduce en un 71 % de significancia, con una DE $\pm 1,5$ siendo estadísticamente significativo. Estos resultados demuestran que existe una relación significativa entre las variables estudiadas y el método diagnóstico (hisopado en cavidad oral), aun cuando existen variables que no fueron consideradas pero sí son importantes, como el uso de terapia con antibióticos y los procesos inflamatorio asociados.

El presente estudio demuestra que una técnica sencilla como el hisopado de cavidad oral, es un examen fácil, rápido y económico este puede ser empleado como método de pesquisa para determinar la infección por VPH en población de riesgo y por ende hacer diagnóstico de lesiones en etapa pre maligna, lo cual implicaría beneficios desde el punto de vista oncológico, al disminuir el número de casos en estados avanzados de cáncer de cavidad oral que hasta ahora son el

60 % del diagnóstico e implican tratamientos combinados, complicados y en muchas ocasiones pobre sobrevida.

La mayor presencia del VPH en nuestro estudio por sexo fue en el femenino siendo pacientes que presentaban más de 3 a 5 parejas por año, ubicándose entre los 23 y 48 años de edad en la población estudiada, de los cuales el 100 % de ellos refirió inicio precoz de relaciones sexuales antes de los 20 años; estos siguen siendo factores importantes en el cáncer de cavidad oral; en los últimos años la infección del VPH viene tomando un rol importante como factor principal en los casos de cáncer de cuello uterino, y ano.

Existe una correlación histopatológica de los casos positivos, (100 %) fundamentalmente en referencia al número de parejas por año. En nuestro estudio los casos positivos para VPH mantenían relaciones sexuales orales en un rango de 3-5 parejas por año.

De los casos positivos para aparición de VPH, se realizó tipificación en uno solo, resultando una cepa no oncogénica número 11, por determinación de PCR, en el resto de los estudiados, no se realizó dicha determinación dada las limitaciones socioeconómicas y culturales de la población objeto de estudio. Podemos concluir que la técnica aquí presentada, se podría incluir como método de pesquisa en la población a riesgo a infección de VPH y por ende hacer diagnóstico en etapas pre malignas de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Ball E. Virus Papiloma Humano. Biología molecular, genética y mecanismos oncogénicos. *Dermatol Venez.* 1998;36(4):136-141.
2. Bradwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ, MacConnell P, Bodian C, Urken M, et al. HPV detection using "Hot Start" polymerase chain reaction in patients with oral cancer: A clinicopathological study of 64 patients. *Mod Pathol.* 1994;(7):1994:720-727.
3. Brocker T, Botcham M. Papillomavirus retrospectives and prospective. *Cancer Surv.* 1986;4:17-36.
4. Capote E. Virus Papiloma Humano en: Ginecología Ediciones. León Barcelona España; 1996:115-122.
5. Cruz I, Napier SS, Van der Waal I, Snijders PJ,

- Walboomers JM, Cowan CG, et al. Suprabasal p53 immunoexpresion is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol*. 2002;55(2):98-104.
6. Derancourt CG. Mucosal oncogenic human papilloma viruses and extra genital bowen disease. *Cancer*. 1999;86:282-287.
 7. D'costa J, Saranath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta A. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol*. 1998;34:413-420.
 8. Er-Jia Mao. Prevalence of human papilomavirus 16 and nucleoli organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80:320-329.
 9. Feoli-Fonseca JC, Oligny L, Sijmard P, Falconi S, Yotov W. Human papilomavirus (VPH). Study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. *J Med Virol*. 2001;63:284-292.
 10. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Bravo EF, Fernández M JA, Gonzalez-Moles S. Presence of HPV 16 sequences in oral squamous cell carcinomas. *Med Oral*. 1996;1:79-84.
 11. Virus Papiloma Humano. En: Gross G, editor. Microbiología. 4ª edición. Buenos Aires, Argentina: editorial Berlin; 1990.p.837.
 12. Harrison F, editor. Principios de Medicina Interna. 14ª edición. Nueva York, NY: Mc Graw- Hill - Interamericana; 1998.
 13. Fernández H, Bagán S, Basterra A, Lloria ME. Prevalencia de liquen plano oral y leucoplasia oral en 112 pacientes con carcinoma oral de células escamosas. *Act Otorrinolaring Esp*. 2001;52:239-243.
 14. Jenkins D. Diagnosis Human papillomavirus: Recent advances. *Curr Opin in Infect Dis*. 2001;14:53-62.
 15. Lippman S. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med*. 2001;26:344.
 16. Lorinez A. Molecular methods for detection of human papilomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1996;23(3):707-715.
 17. Mandell G, Bennett J, Dolin R, editores. En: Enfermedades infecciosas. Principios y Prácticas. 5ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2002.p.1991-2002.
 18. Paparella P. Otorrinolaringología. 3ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1991.
 19. Pfister H. Biology and bio chemistry of Papillomaviruse types. *Rev Phisiol Biochem Pharmacol*. 1984;99:112-181.
 20. Premoli G, Galindo-Castro I, Ramírez JL. A system detection and typing human papillomavirus of the lower genital tract: In situ hybridization screening and polymerase chain confirmation. *Invest Clin*. 2005;46(4):369-379.
 21. Premoli G, Galindo Y, Ramírez J, Possone M, Rivero H. Detection of Humans Papillomavirus related oral verruga vulgares among Venezuela. *J Oral Pathol*. 1993;22:3-7.
 22. Premoli-De-Percoco G, Ramirez JL. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Merida, Venezuela. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: Evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;125(1):1-9.
 23. Regezi J, Sciubba J. Patología Bucal. 2ª edición. México, DF: Editorial Interamericana Mc Graw - Hill; 1995:184-197.
 24. 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):1183-1188.
 25. Silverberg SG, editor. En: Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytophatology. 3ª edición. Nueva York, NY: Churchill Livingstone; 1997.p.1430-1440.
 26. Sonera A, Fonsesa N. Lesión de la mucosa oral en niños indios de la Misión los Ángeles del Tokuko. Venezuela. *Odontología*. 1964;(2):109-122.
 27. Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Kppang H, Danielsen H, Reith A. DNA Content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med*. 2001;344:1270-1278.
 28. Sudbo J, Kildal W, Johannessen AC, Koppang HS, Sudbo A, Danielsen HE, et al. A. Gross genomic aberrations in pre cancer: Clinical implications of a long-term follow-up study in oral erythroplakias. *J Clin Oncol*. 2002;15;20(2):456-462.
 29. Yamaguchi T, Shindoh M, Amemiya A, Inoue N, Kawamura M, Sakaoka H, et al. Detection of human papilloma virus type 2 related sequence in oral papilloma. *Ann Cell Pathol*. 1998;16(3):125-130.