



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**FRECUENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
LA MUCOSA BUCAL, EN ESTUDIANTES DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM.**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

JAQUELINE RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

**TUTOR: DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON
ASESOR: DR. HIGINIO ARZATE**

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Características del VPH	6
2.2. Métodos de detección del VPH	10
2.2.1. Estudio histológico	10
2.2.2. Técnicas de detección del VPH	11
2.2.2.1. Inmunohistoquímica	11
2.2.2.2. Hibridación <i>in situ</i>	11
2.2.2.3. Southern blot	12
2.2.2.4. Dot blot	13
2.2.2.5. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	13
2.3. Transmisión del VPH y factores de riesgo	14
2.4. Detección del VPH en la cavidad bucal	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVO GENERAL	33
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
8. METODOLOGÍA	34
8.1. Tipo de estudio	34
8.2. Población de estudio	34
8.3. Muestra	34
8.4. Criterios de inclusión	34
8.5. Criterios de exclusión	35
8.6. Variables de estudio	35
8.6.1. Variables independientes	35
8.6.2. Variables dependientes	35
8.7. Método	36

9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIÓN	49
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

FRECUENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN LA MUCOSA BUCAL, EN ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de papiloma humano (VPH) presenta características biológicas específicas para infectar las células basales del epitelio y la mucosa; de acuerdo a su composición genética se han identificado más de 130 genotipos, los cuales se han clasificado en VPH de alto y bajo riesgo oncogénico de acuerdo a su capacidad para transformar a las células infectadas.

En la cavidad bucal se ha asociado frecuentemente con neoplasias benignas y malignas; sin embargo, la presencia del mismo en la mucosa bucal clínicamente sana es controversial, ya que las investigaciones realizadas hasta el momento han reportado resultados opuestos con la evaluación de un número reducido de individuos, y el empleo de diversas técnicas de detección del virus.

Los métodos utilizados para detectar el VPH varían ampliamente en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Las técnicas de biología molecular son capaces de detectar el ADN del VPH en las células infectadas, de las cuales, la que presenta mayor sensibilidad es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ya que tiene la capacidad de detectar el ADN viral si éste se presenta en por lo menos una copia en las células.

La detección del VPH reviste gran interés en la vigilancia epidemiológica, debido a que la prevalencia de infección por el mismo ha incrementado en la

población sexualmente activa; no obstante, este interés se acrecienta para el odontólogo debido al conocimiento de su potencial oncogénico y la asociación entre la presencia de genotipos del VPH de alto riesgo en la mucosa bucal y el cáncer de la cavidad bucal y orofaríngeo.

La revisión bibliográfica y el protocolo realizados en el presente trabajo forman parte de una primera fase de investigación acerca de la presencia del VPH en la cavidad bucal; en efecto, se llevará a cabo una segunda fase experimental en la cual se desarrollará este protocolo de investigación con el objetivo de determinar la frecuencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana de estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM. Dicha fase experimental no se realizó debido al tiempo requerido para la misma, el cual no coincide con el tiempo proporcionado para la elaboración de la tesina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Características del VPH

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, género *Papillomavirinae*; infecta exclusivamente células epiteliales y mucosas.¹ Mide alrededor de 55 nm de diámetro, presenta simetría icosaédrica con una cápside de 72 capsómeros sin envoltura lipoproteica. Su genoma está compuesto por ADN bicatenario circular constituido por 8000 pares de bases (pb), el cual se encuentra dividido en tres regiones: región temprana (E), región tardía (L) y región larga de control (RLC).¹⁻⁸ La información genética del VPH se localiza sólo en una hebra de su ADN.^{2, 3, 8}

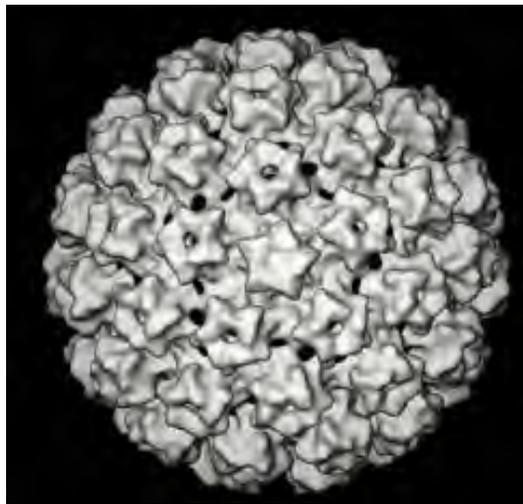


FIGURA 1. Electromicrofotografía del VPH.

La región E codifica las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7,^{2, 3, 4} que participan en la replicación viral y la expresión genética del virus.¹ E1 y E2 regulan la transcripción temprana del ADN viral; adicionalmente E2 juega un papel importante en la expresión de los oncogenes virales.^{1, 8}

Las proteínas E4 y E5 se expresan en la etapa tardía del ciclo de replicación del virus,^{2, 8} están presentes en los estratos espinoso y granuloso del epitelio durante la infección productiva; además E5 participa en la transformación neoplásica *in vitro*, generalmente secundaria a modificación de factores de crecimiento.¹

E6 y E7 del VPH codifican las oncoproteínas virales,^{2, 3, 4, 8} participan en el proceso de transformación viral mediante la unión y desactivación de los genes supresores de tumores p53 y Rb respectivamente.^{1, 4, 8}

Al inducir la degradación del gen p53, E6 induce inestabilidad genómica celular al inhibir la apoptosis de las células infectadas. El gen Rb es un regulador negativo del ciclo celular que frena el paso de la fase G1 a la fase S; cuando E7 secuestra Rb, el ciclo celular progresa y la célula se divide sin control.¹

La región L codifica las proteínas de la cápside L1 y L2 que se expresan en las fases finales de la infección,^{4, 9} ya que los genes L sólo son codificados cuando la célula escamosa se diferencia.² L1 representa más del 90% de las proteínas de la cápside viral, la cual se conserva en gran parte de los diferentes tipos de VPH; asimismo es el receptor viral que interactúa con la célula hospedera;¹ por otra parte, L2 constituye menos de 5% de la cápside.²

La Región Larga de Control (RLC) también es conocida como región reguladora de corriente ascendente o no codificante (NC). Contiene secuencias reguladoras y el origen de la replicación del ADN,² su tamaño oscila entre 800 y 1000 pb dependiendo del tipo de VPH. Su secuencia nucleotídica es variable entre los diferentes genotipos virales, sin embargo conserva elementos de regulación comunes a todos ellos.³

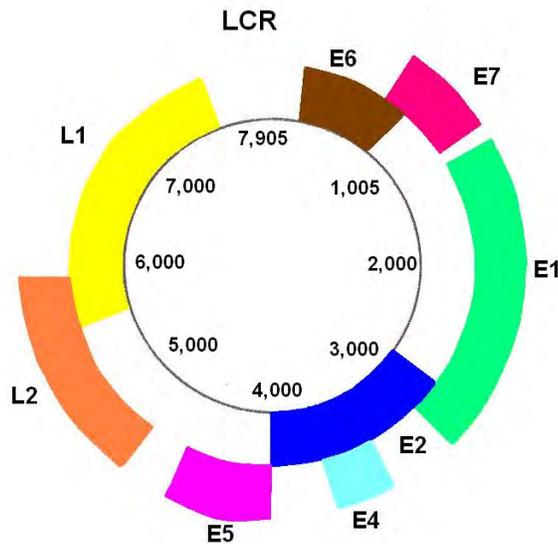


FIGURA 2. Representación esquemática del genoma del VPH.

El ciclo de replicación del VPH está influenciado por el estado de maduración de las células infectadas,⁹ infecta la capa basal de la piel o la mucosa a través de abrasiones o heridas;^{3, 4} la unión del virus a la superficie celular está mediada por la proteína viral L1, que interactúa con moléculas de proteoglicanos (heparan sulfato) y a continuación requiere de la interacción con el correceptor formado por las integrinas $\alpha 6/\beta 1$ o $\alpha 6/\beta 4$, cuya expresión se observa únicamente en el estrato basal del epitelio. Una vez que el VPH penetra a la célula por endocitosis, el genoma viral es transportado al núcleo celular donde es traducido y transcrito.¹

De acuerdo al ciclo de replicación que lleve a cabo el virus se puede producir una infección latente o productiva.

La **infección latente** se define como una infección viral sin la producción de virus infeccioso, es decir, el ADN viral permanece en el núcleo como episoma. El epitelio permanece clínica e histológicamente normal ya que existe un bajo número de copias de ADN del VPH en las células basales, por lo cual la infección no puede transmitirse. El virus puede permanecer latente

durante largos períodos, se puede eliminar por el sistema inmune, o puede ser activado e iniciar una infección productiva.^{1, 2, 9}

En la **infección productiva** se replica el material genético viral y se producen viriones. Este proceso ocurre en las células superficiales en relación con la maduración epitelial, finalizando con la producción de proteínas de la cápside y el ensamble de nuevas partículas virales. Las células infectadas muestran los efectos citopáticos característicos de la infección por VPH.² La infección subclínica es activa pero no presenta signos clínicos, por su parte, la infección clínica se caracteriza por la presencia de lesiones epiteliales.⁹

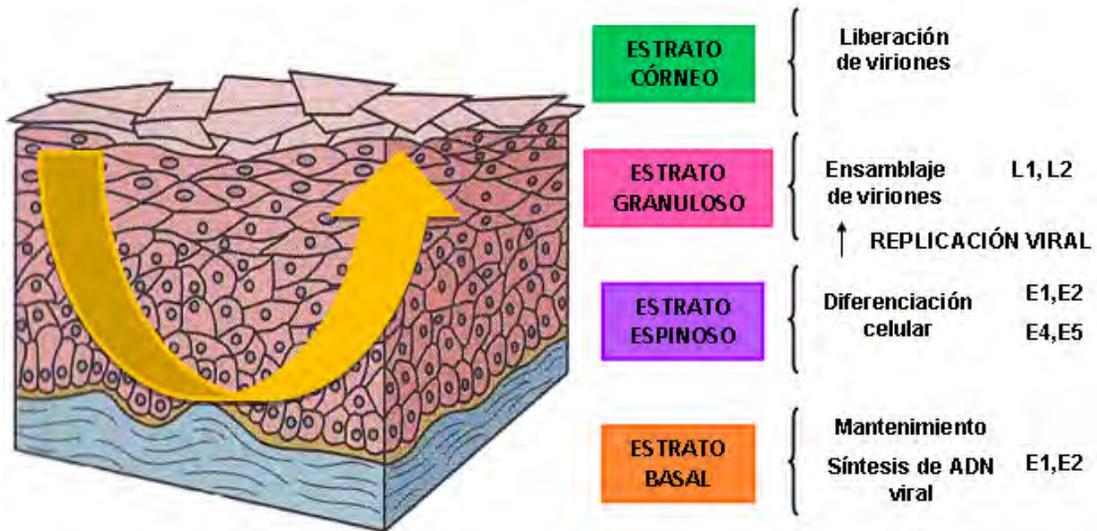


FIGURA 3. Representación esquemática del ciclo de replicación del VPH.

2.2. Métodos de detección del VPH

2.2.1. Estudio histológico

Es posible establecer un diagnóstico de presunción de acuerdo a las características clínicas de las lesiones producidas por el VPH, sin embargo, es necesario realizar la escisión quirúrgica de las lesiones y analizarlas histológicamente.⁵ Los cambios histológicos relacionados con la presencia del VPH incluyen signos clásicos y no clásicos, los cuales se mencionan a continuación:

Signos clásicos: La presencia de coilocitos es considerada como la principal evidencia relacionada con la presencia del VPH; caracterizados por un halo perinuclear claro rodeado de un anillo citoplasmático, el núcleo es multilobulado e hiper cromático.¹⁰

Signos no clásicos:

- a) Coilocitosis parcial, es decir, las células del estrato espinoso muestran algún aclaramiento citoplasmático de diferentes tamaños y formas, pero carecen de cavitación perinuclear, bordes irregulares y cambios nucleares.
- b) Pequeñas células disqueratósicas con aumento del tamaño nuclear, variaciones en la relación núcleo - citoplasma y condensamiento de la cromatina.
- c) Anomalías nucleares leves, tales como los núcleos en forma de huso o triangular con cromatina condensada.
- d) Multinucleación o núcleo multilobulado.
- e) Gránulos irregulares de queratohialina.
- f) Células epiteliales mitóticas por encima de la capa basal.¹⁰

2.2.2. Técnicas de detección del VPH

Las técnicas de detección del VPH varían en la sensibilidad y especificidad para la detección, por lo cual se han clasificado en tres categorías: de baja sensibilidad, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*; de moderada sensibilidad, Southern blot, dot blot; y de alta sensibilidad, reacción en cadena de polimerasa (PCR).⁵

2.2.2.1. Inmunohistoquímica

Es una técnica basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Permite la identificación de los antígenos virales presentes en las células infectadas (sobre preparaciones citológicas o en tejidos embebidos en parafina) mediante la utilización de anticuerpos específicos que contienen marcadores reactivos o químicos, los cuales se unen a los antígenos del virus. Es posible la identificación del virus por el marcaje del anticuerpo, el cual hace visible el complejo antígeno-anticuerpo.^{4, 11,12}

2.2.2.2. Hibridación *in situ*

Permite la detección del ADN del VPH en frotis o muestras de tejido,⁵ tiene como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, que da lugar a la doble cadena de ADN. Cuando el ADN es sometido a altas temperaturas se desnaturaliza, es decir, se rompen las bases complementarias que normalmente mantienen unidas las dos cadenas de la doble hélice; disociándose en dos hebras separadas. Si dichas hebras desnaturalizadas de ADN se mantienen a 65 °C durante un período prolongado, forman nuevamente una doble hélice por apareamiento complementario de bases; a éste proceso se le denomina hibridación.

Se emplean moléculas de ADN de cadena sencilla con una secuencia de nucleótidos específicos, que contienen marcadores reactivos o químicos; a

las cuales se les conoce como sondas. Una vez que el ADN celular es desnaturalizado, se añade la enzima ADN polimerasa y los nucleótidos marcados y se mantiene a 65 °C; permitiendo de esta manera que las cadenas de ADN complementarias se apareen entre sí. La sonda se hibrida con las secuencias complementarias del ADN celular; que pueden ser detectadas entonces como moléculas reactivas de doble cadena.^{12, 13}

Para detectar el ADN viral se emplean sondas con secuencias complementarias al ADN del VPH; lo que permite la hibridación entre las secuencias complementarias virales presentes en el ADN desnaturalizado y la sonda.⁵

2.2.2.3. Southern blot

Es posible detectar el ADN mediante el empleo de enzimas de restricción que digieren el ADN viral, generando fragmentos de ADN (fragmentos de restricción) que se separan por electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a su tamaño.

Una vez que las enzimas de restricción cortan el ADN, los fragmentos de restricción son desnaturalizados y se transfieren por capilaridad del gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa; las posiciones de los fragmentos de ADN en el gel se mantienen en la hoja de nitrocelulosa, donde pueden exponerse a una solución salina tamponada que contiene la sonda de ADN viral monocatenario marcada radioactivamente; debido a que la membrana se expone a la sonda durante un tiempo prolongado, se favorece la hibridación entre el ADN atrapado en la nitrocelulosa y la sonda radioactiva. Cada secuencia complementaria da lugar a una banda marcada, que adquiere una posición determinada por el tamaño del fragmento del ADN. El ADN que ha hibridado aparece en forma de bandas en la película fotográfica.

¹³

La técnica Southern blot tiene la misma base que el Wester blot, sin embargo este último es utilizado para detectar la presencia de proteínas específicas

en el tejido o células a analizar, mediante el empleo de anticuerpos que interaccionan de modo selectivo con las moléculas proteínicas. El anticuerpo unido al filtro puede ser detectado mediante radioactividad o tinción.¹⁴

2.2.2.4. Dot blot

Se utiliza ADN de las células o tejido infectado, el cual es desnaturalizado y colocado directamente como una mancha sobre una membrana de nitrocelulosa; posteriormente el ADN presente en la membrana es sometido a hibridación con una sonda marcada.

2.2.2.5. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Es un proceso cíclico térmico de alta sensibilidad que se caracteriza por la replicación de pequeñas cantidades de secuencias específicas de ADN *in vitro* que pueden ser detectadas.¹⁵

El conocimiento de la secuencia de ADN que se desea replicar, permite sintetizar dos oligonucleótidos sintéticos compuestos por 15 a 20 bases nitrogenadas, llamados primers, iniciadores o cebadores; cada uno de los cuales es complementario a la secuencia de una de las cadenas de la doble hélice de ADN original, en los extremos opuestos de la región que se desea replicar. Estos oligonucleótidos actúan como iniciadores de la síntesis *in vitro* del ADN y determinan el segmento de ADN que será replicado; para el proceso de síntesis se utiliza la enzima ADN polimerasa y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs)^{13, 16}

Un ciclo de PCR consta de tres etapas:

Desnaturalización del ADN. La cadena del ADN de doble hélice se separa por calentamiento. El tiempo requerido para la desnaturalización depende de la complejidad y el volumen de la reacción, generalmente se lleva a cabo con una temperatura de 95 °C durante 30 segundos ó a 97 °C durante 15 segundos.^{15,16}

Acoplamiento. Los primers hibridizan con las secuencias complementarias de la hebra de ADN complementaria. La temperatura y el tiempo requerido para la alineación dependen de la composición, longitud y concentración de los oligonucleótidos, sin embargo la temperatura debe descender a 55 °C.^{15, 16}

Síntesis de ADN. La enzima ADN polimerasa termoestable (*Taq* Polimerasa) y los cuatro dNTPs inician la síntesis de ADN a partir de los primers.¹³ Generalmente se lleva a cabo a una temperatura de 72 °C.¹⁵

El ciclo se lleva a cabo de manera repetitiva hasta 35 veces aproximadamente, comenzando en cada uno con la desnaturalización de cada fragmento nuevo sintetizado, el resultado es una acumulación exponencial de fragmentos específicos de ADN, aproximadamente 2^n (n es el número de ciclos de amplificación).¹⁶

Para la amplificación del VPH se emplean primers que amplifiquen regiones específicas del ADN viral.

2.3. Transmisión del VPH y factores de riesgo

La infección por VPH se adquiere principalmente por transmisión sexual.^{9, 17} Se ha considerado la transmisión a la cavidad bucal a través de la vía materno – fetal, a través de lesiones en la piel de una persona a otra o por autoinoculación.^{4, 9} En los adultos el principal mecanismo de infección bucal por VPH es la práctica de sexo oral;^{4, 9, 17, 18} sin embargo la detección simultánea de verrugas en la piel y la presencia del VPH en la cavidad bucal han sugerido la posibilidad de transmisión de las manos a la boca, paralelamente a la transmisión de los dedos de las manos a los genitales;¹⁹ de hecho, Helen Trottier *et al.*, en el artículo *The epidemiology of genital*

human papillomavirus infection; refiere que “el VPH de bajo riesgo se ha detectado en los dedos de individuos con verrugas genitales.”²⁰

Winer *et al.*, en Washington, en el año 1997²¹ evaluaron la presencia del VPH genital en estudiantes universitarias, de las cuales 757 no presentaron antecedentes de relaciones sexuales vaginales y 13 (1.7%) resultaron positivas para el VPH en el tracto genital con la técnica PCR.

La incidencia de la infección acumulada en 24 meses en la población de estudio fue de 2.4%; de tal manera que cualquier tipo de contacto sexual sin penetración se asoció con un mayor riesgo de infección genital por VPH.

Otra forma de transmisión es a través de fómites^{19, 22} o saliva.¹⁹ Los factores asociados con la prevalencia de infección por VPH en la cavidad bucal incluyen edad, práctica de sexo oral, el número de parejas sexuales, besar con la boca abierta, uso de tabaco, estado inmunológico y la presencia de otras infecciones.^{5, 9, 17} El riesgo de contagio aumenta en homosexuales, bisexuales, fumadores crónicos, personas promiscuas, drogadictos y pacientes inmunosuprimidos.²²

El Centro de Control de Infecciones (CDC) ha estimado que por lo menos la mitad de los individuos sexualmente activos pueden adquirir VPH genital en alguna etapa de su vida.^{17, 23} Las tasas más altas de infección se encuentran en mujeres sexualmente activas menores de 25 años de edad, mientras que menos del 80% de las mujeres adquirirán una infección por VPH a los 50 años.²³ Una posible explicación es que los individuos infectados desarrollan respuestas inmunitarias adaptativas contra el VPH, de esta manera se previenen infecciones futuras.²⁰

En el artículo *HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women* publicado en Iowa, en el año 2004, se propone que en contraste con las infecciones genitales por VPH, la frecuencia y el riesgo de

infección en la cavidad bucal aumenta con la edad; ²⁴ de igual manera, el artículo *Estudio Clínico – Patológico Retrospectivo de Papiloma de la Mucosa Bucal en una población venezolana* publicado en el año 2002, refiere que estudios previos realizados por Greer y Goldman en 1974, y por Premoli y Christensen en 1985 concluyen que la edad promedio en la que se presentan lesiones bucales por el VPH es de 38 años, con una mayor incidencia entre los 30 y 50 años. ²²

La edad a la que se inicia la actividad sexual puede aumentar el riesgo de infección, ya que está asociado con un mayor número de parejas sexuales a lo largo de la vida y predisposición para tener nuevas parejas sexuales con más frecuencia. ²⁰

D' Souza *et al.*, en Estados Unidos, en el año 2009 ¹⁷ valoraron 542 individuos (210 hombres de 19 años de edad promedio y 332 controles de estudio de 57 años de edad media) con el objetivo de conocer la relación entre el comportamiento sexual y la presencia del VPH en la cavidad bucal. El VPH en la cavidad bucal fue detectado en 4.8% de los individuos control, y en 2.9% de los individuos jóvenes.

Además evaluaron la asociación entre la infección por VPH en la cavidad bucal y el número de parejas sexuales de los 12 meses previos al estudio. El número de parejas sexuales orales recientes y el número de parejas que besan con la boca abierta se asoció con la infección por VPH más que con las parejas sexuales vaginales; lo cual indica la importancia de estas actividades en la transmisión del virus a la cavidad bucal. Este estudio sugiere que las infecciones bucales son probablemente resultado del contacto orogenital; además, la probabilidad de infección por VPH aumenta en relación con el incremento del número de parejas sexuales (sexo oral o vaginal) a lo largo de la vida y decrece un 6% para personas mayores de 30 años.

Sin embargo, otras investigaciones realizadas con el objetivo de conocer la concordancia entre infecciones bucales y genitales producidas por el VPH, han reportado que la práctica de sexo oral no presenta asociación con la infección en la cavidad bucal; ^{19, 24, 25} asimismo no se ha relacionado la presencia del VPH en la cavidad bucal y genital en pacientes con infecciones genitales por VPH. ²⁵ Dichas investigaciones se mencionan a continuación.

Smith *et al.*, en Iowa, en el año 2004 ²⁴ realizaron un estudio para detectar el VPH por medio de la técnica PCR, para lo cual emplearon los primers MY09/MY11; dot blot y secuenciación de ADN en 557 mujeres embarazadas, con el objetivo de relacionar la presencia del virus en la cavidad bucal y en el cuello uterino; al mismo tiempo, se analizaron muestras de la cavidad bucal de 68 parejas sexuales masculinas actuales que visitaron la clínica con algunas mujeres. La prevalencia del VPH en las mujeres fue del 29% en el cuello uterino y 2.4% en la cavidad bucal. La tasa de positividad del VPH en muestras bucales de los hombres fue del 5.9%. Debido a la falta de concordancia en los resultados del análisis de las muestras, el estudio propone que el contacto sexual oral y la autoinoculación del virus son mecanismos poco frecuentes de la transmisión del mismo.

Marjut *et al.*, en Turku, en el año 2005 ¹⁹ efectuaron un estudio en 331 mujeres en el tercer trimestre de embarazo y 131 hombres que eran parejas sexuales actuales de algunas de las mujeres evaluadas. Se tomaron muestras de la mucosa bucal y genital cada 2, 6, 12 y 24 meses; las cuales se analizaron por PCR con los primers MY09/MY11.

No se encontró asociación entre la infección por VPH bucal, genital y el comportamiento sexual. Del mismo modo, la Infección por VPH del líquido seminal no tuvo relación con los genotipos virales detectados en la cavidad bucal de la pareja femenina; lo cual afirma que no existe asociación entre las infecciones bucales y genitales por VPH entre los

cónyuges. Sin embargo, la persistencia del VPH en la cavidad bucal, incrementa el riesgo de persistencia de la infección viral en la cavidad bucal del cónyuge.

Xavier *et al.*, en Brasil, en el año 2009 ²⁵ concluyeron que existe poca relación entre la presencia del VPH en la mucosa anogenital y bucal al realizar una investigación en 30 pacientes masculinos entre 15 y 60 años de edad con lesiones anogenitales por VPH confirmadas por PCR e hibridación inversa.

Los primers utilizados para detectar el VPH fueron MY09/MY11. El 90% de los pacientes presentaron mucosa bucal aparentemente sana, a los cuales se les tomaron muestras por raspado bilateral de la mucosa bucal, de la superficie dorsal y ventral de la lengua para analizarlas mediante la técnica PCR. No se reportó la presencia del VPH en estos pacientes. Por otro lado, 10% de los pacientes presentaron lesiones bucales, de los cuales el 3% resultó positivo para el VPH. La prevalencia del VPH en la mucosa bucal fue del 3.3%.

Galvão Castro *et al.*, también en Brasil, en el año 2009 ¹⁸ llevaron a cabo un estudio en 30 mujeres entre 14 y 51 años de edad con infección genital clínica o subclínica por VPH. Las mujeres fueron sometidas a examen ginecológico, colposcopia y biopsia de las lesiones genitales.

Las muestras de la cavidad bucal se tomaron por cepillado de 6 áreas anatómicas: paladar blando, úvula, amígdalas, dorso de la lengua, área sublingual y mucosa yugal; se analizaron por PCR con el empleo de los primers MY09/MY11. Con la técnica PCR, el 57% de las muestras genitales resultaron positivas para el VPH; mientras que el 100% de las muestras de la cavidad bucal fueron negativas. Estos resultados sugieren que el VPH genital no es un factor que predispone a la infección de la cavidad bucal.

El tabaquismo se ha considerado un factor de riesgo para la infección bucal por VPH, sin embargo existen opiniones contrarias.

Por un lado, se considera que las probabilidades de infección en la cavidad bucal por VPH son más elevadas entre los fumadores,¹⁷ ya que se puede alterar potencialmente el epitelio bucal, lo cual puede influir en la expresión del VPH en la cavidad bucal;¹⁵ sin embargo no se encuentra asociación entre el uso acumulativo del cigarro y la presencia del virus en la cavidad bucal.¹⁷ Helen Trottier *et al.*, afirma que el tabaco puede contribuir a daños genéticos adicionales de las células epiteliales, contribuyendo al inicio de los eventos provocados por la infección del VPH (por ejemplo, interferencia con los genes p53 y Rb por la expresión de los oncogenes virales E6 y E7).²⁰

Por otro lado, se ha considerado que el tabaco puede tener un efecto preventivo en la infección por VPH en la cavidad bucal y la orofaringe; resultado probablemente del incremento de la queratinización de la mucosa, la cual actúa como barrera natural contra microtraumas y disminuye la susceptibilidad a la infección de la capa basal por el VPH.⁴

No existe suficiente evidencia que soporte la asociación entre el estatus nutricional y el riesgo de infección por el VPH,²⁶ sin embargo, los alimentos con alto contenido de carotenos y vitamina C se relacionan con la reducción de la persistencia del virus; así como el incremento de niveles de ácido fólico con la disminución del riesgo de infección por VPH de alto riesgo.^{4, 20} Específicamente los nutrientes antioxidantes como los carotenos, tocoferoles y retinol, se ha sugerido que tienen un efecto protector en la persistencia del VPH y en la displasia cervical. Algunos mecanismos de acción incluyen la pérdida de radicales libres antes del daño celular y del incremento de replicación y expresión viral; mejora del sistema inmunológico promoviendo la eliminación del VPH, además que la vitamina A modula la maduración de las células epiteliales.²⁶ Los bajos niveles de ácido retinoico suponen una

falta de control en el crecimiento de los epitelios lo que podría iniciar el desarrollo de lesiones malignas. ²⁷ Adicionalmente, las mujeres que consumen más frutas y verduras, pueden tener otros comportamientos saludables. ²⁶

Las personas inmunodeprimidas tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar infección por VPH y de experimentar un curso más agresivo de la infección que las personas inmunocompetentes. El sistema inmunológico juega un papel importante en el control de la infección por VPH, debido a que se encuentra intracelularmente a salvo de la vigilancia inmunológica del huésped hasta que el virus se ha dividido suficiente número de veces o los queratinocitos infectados son exfoliados. ⁹

El uso de preservativo masculino es controversial en la prevención de la infección por VPH. El glande, la corona, el prepucio y el cuerpo del pene están cubiertos cuando un preservativo es utilizado correctamente; sin embargo otras áreas, tales como el escroto y la región inguinal, las cuales no son cubiertas por el preservativo, pueden albergar el virus; además que se presume que el VPH se puede transmitir por contacto sexual sin penetración. ^{21, 28}

Winer *et al.*, en Washington, en el año 2006 ²⁹ evaluaron la relación entre el uso de preservativo masculino y la infección por el VPH genital. La población estudio fueron 82 estudiantes universitarias sin antecedentes de relaciones sexuales vaginales o que su primera relación sexual vaginal hubiese sido en los últimos 3 meses. Se les tomaron muestras cervicales y vulvovaginales para la detección del VPH por PCR y citología cervical cada 4 meses; así mismo las mujeres utilizaron agendas electrónicas para registrar información diaria sobre el número de encuentros sexuales vaginales, la frecuencia de

uso de preservativos por sus parejas masculinas, y el número de nuevas parejas sexuales.

La incidencia de la infección genital por VPH fue de 37.8% entre las mujeres cuyas parejas usaron preservativo para todos los casos de relaciones sexuales, en comparación con 89% en las mujeres cuyas parejas usaron preservativo menos del 5% del tiempo.

No se detectaron lesiones cervicales en las mujeres que presentaron informes del 100% de uso de preservativo por sus parejas, mientras que 14 lesiones intraepiteliales escamosas se detectaron en las mujeres cuyas parejas no utilizaron preservativo o lo utilizaron con menor frecuencia. Este estudio sugiere que el uso frecuente del preservativo esta asociado con la disminución del riesgo de infección genital por el VPH.

Por otro lado, Helen Trottier *et al.*, sostiene que el uso del preservativo puede aumentar el riesgo de infección por VPH, ya que es frecuente utilizar preservativo con las parejas que se considera tener mayor riesgo, por ejemplo parejas nuevas, parejas ocasionales, o al tener relaciones con trabajadoras sexuales; pero no con parejas que se consideran estables, como parejas a largo plazo o cónyuges.²⁰

2.4. Detección del VPH en la cavidad bucal

El VPH presenta tropismo por las células epiteliales y se han identificado más de 130 genotipos,³⁰ de los cuales 25 se han asociado a lesiones de la cavidad bucal (VPH-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72 y 73) .⁵ Según su composición genética, se han clasificados de acuerdo a su potencial oncogénico en VPH de alto y bajo riesgo; de tal forma que distintas manifestaciones clínicas están asociadas con genotipos específicos del virus.⁹ Algunos tipos de VPH de bajo riesgo

son VPH-2, 4, 6, 7, 11, 13, 32, 43 y 44; entre los de alto riesgo se encuentran VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.^{4, 9}

Los genotipos de bajo riesgo oncogénico están relacionados con una variedad de lesiones benignas; en la cavidad bucal incluyen papiloma plano, verrugas comunes, condiloma acuminado e hiperplasia epitelial focal, además, en otras áreas anatómicas se asocia a verrugas comunes, verrugas plantares, verrugas genitales, papilomatosis laríngea y papilomatosis conjuntival.^{2,4}

Los genotipos de alto riesgo, en particular VPH-16 y -18, están vinculados con el desarrollo de lesiones potencialmente malignas, como el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, principalmente el de orofaringe (CCSO);^{2, 6, 17} así como el cáncer anogenital y cervicouterino.^{2, 4}

Asimismo, se ha sugerido que la presencia del VPH en la mucosa bucal clínica e histológicamente sana, incluye infecciones latentes y/o subclínicas con un bajo número de copias del virus en las células basales,^{2, 4, 5, 9} sin embargo, los genotipos detectados frecuentemente corresponden a VPH de alto riesgo,^{4, 31, 32} por lo cual el análisis de la relación entre la prevalencia de la infección en forma latente y el desarrollo del cáncer bucal es de vital importancia.

Distintas investigaciones han identificado diferentes tipos de VPH en la mucosa bucal clínicamente sana, no obstante, existe gran variación en el porcentaje de detección del virus por PCR, que oscila del 100% (Tominaga *et al.*, 1996; Terai *et al.*, 1999) al 0% (Eike *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 1996; Mao *et al.*, 1996; Pillai *et al.*, 1999; Bustos *et al.*, 1999, Sand *et al.*, 2000) dependiendo de la población de estudio, el método de toma de la muestra y la elección de la técnica de identificación del virus.⁵ En las tablas 1 y 2 se muestra la recopilación de los resultados de diversos autores para la detección del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana.^{4, 5}

AÑO	INVESTIGADOR	TÉCNICA	# P / # C	%	TIPOS DE VPH
1992	Kellokoski <i>et al.</i>	PCR	18/78	23	6, 11, 16(83%), 18(17%)
		SB	33/212	15	2, 6, 11, 13, 16, 18
1992	Jalal <i>et al.</i>	PCR	21/48	44	16
1993	Holladay y Gerald.	PCR	1/6	17	16
1995	Eike <i>et al.</i>	PCR	0/61	0	-
1995	Mao <i>et al.</i>	PCR	4/26	15	16
1996	Tominaga <i>et al.</i>	PCR	3/3	100	6
		SB	0/3	0	-
1996	Cruz <i>et al.</i>	PCR	0/12	0	-
1996	Mao <i>et al.</i>	PCR	0/6	0	-
1998	D' Costa <i>et al.</i>	PCR	15/48	31	16
1998	Badaracco <i>et al.</i>	PCR	4/22	18	6(20%), 16(50%), 31, 11(10%)
1999a	Terai <i>et al.</i>	PCR	26/30	87	18(87%), 61(60%), 59(23%), 16(7%)
1999	Pillai <i>et al.</i>	ISH	0/10	0	-
1999	Bustos <i>et al.</i>	ISH	0/33	0	-
2003	Surgyama <i>et al.</i>	PCR	16/44	36	16

#=número: P=positivos, C=casos; ISH= hibridación *in situ*; SB= Southern blot; PCR= reacción en cadena de polimerasa

Tabla1. Resultados de diversos autores en la identificación del VPH en mucosa bucal clínicamente sana. ⁵

AUTOR AÑO	EDAD	MUESTRA	MÉTODO DE TOMA DE MUESTRA	TÉCNICA	TOTAL	VPH +	TOTAL %	TIPOS DE VPH
Maitland <i>et al.</i> ,1987	Adultos	Total	Biopsia	ISH	12	5	41.6	16
Scully <i>et al.</i> ,1987	Adultos	Mucosa bucal	Biopsia	ISH	12	4	41	16
Jenison <i>et al.</i> , 1990	Adultos	Mucosa bucal	Cepillado	PCR	35	11	31	6, 16
Yeudall <i>et al.</i> , 1991	Adultos	Mucosa bucal	Biopsia	PCR	25	2	8	18
Jalal <i>et al.</i> , 1992	Adultos	Mucosa bucal	Cepillado	PCR	48	25	52	16
Kellokoski <i>et al.</i> ,1992	Adultos	Mucosa bucal	Biopsia	PCR SB	78 212	18 33	23.1 15.6	6, 11, 16, 18
Cruz <i>et al.</i> , 1996	Adultos	Mucosa gingival	Biopsia	PCR	12	0	0	-
Badaracco <i>et al.</i> ,1998	Adultos	Mucosa bucal	Cepillado	PCR	22	4	18	6, 11, 16, 31
Schwartz <i>et al.</i> ,1998	Adultos	Mucosa bucal	Cepillado	PCR	435	39	9	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35
Smith <i>et al.</i> , 1998	Adultos	Mucosa bucal	Lavado	PCR	205	10	4.8	12, 16, 23, 38, 58, 72
Terai <i>et al.</i> , 1999	Adultos	Mucosa bucal	Cepillado	PCR	30	30	100	6, 16, 18, 59, 61
Sand <i>et al.</i> , 2000	Adultos	Mucosa bucal	Biopsia	PCR	12	0	0	-
Smith <i>et al.</i> , 2004	Adultos	Mucosa bucal	Lavado	PCR	333	61	10.8	16, 18, 31, 58

ISH= hibridación *in situ*; SB= Southern blot hibridación; PCR= reacción en cadena de polimerasa

Tabla 2. Resultados de diversos autores en la identificación del VPH en mucosa bucal clínicamente sana.⁴

Como se mencionó anteriormente, el VPH ha sido relacionado con la patogénesis del cáncer de la cavidad bucal y la orofaringe. La presencia simultánea de agentes químicos e infección por VPH en la mucosa bucal puede favorecer la transformación maligna; en particular el VPH-16 ha sido identificado en el 90% de los VPH asociados con cáncer de cabeza y cuello, y en el 50% de CCOS.¹⁰

AÑO	INVESTIGADOR	LESIÓN	TÉCNICA	# P / # C	%	TIPOS DE VPH
1985	De Villiers <i>et al.</i>	CCE	SB	3/7	43	2, 16
1986	Syrjänen.	CCE	ISH	1/2	50	16
			IHQ	0/2	0	-
1991	Zeuss <i>et al.</i>	CCE	ISH	0/15	0	-
1991	Young <i>et al.</i>	CCE CV	ISH	0/17	0	-
			ISH	0/10	0	-
1993	Holladay & Gerald.	CCE	PCR	7/37	19	16, 18
1993	Noble-Topham <i>et al.</i>	CV	PCR	12/25	48	6, 11(10%), 16(20%), 18(84%)
1994	Ostwald <i>et al.</i>	CCE	PCR/SB	16/26	62	16(45%), 18(35%) 6, 11(15%)
1995	Balaram <i>et al.</i>	CCE	PCR	67/91	74	6(13%), 11(20%), 16(42%), 18(47%)
		CV	PCR	10/15	67	6(10%), 11(20%), 16, 18(60%)
1996	González-Moles <i>et al.</i>	CCE	PCR	11/37	30	
1996	Snijders <i>et al.</i>	CCE	PCR	7/32	22	16
1996	Cruz <i>et al.</i>	CCE	PCR	19/35	55	16(79%), nd (21%)
1998	Mineta <i>et al.</i>	CCE	PCR	3/14	21	16
1998	Wilczynski <i>et al.</i>	CCE	PCR	14/21	64	16(80%), 33(10%), 59(10%)

1998	Premoli-de- Percoco <i>et al.</i>	CCE	ISH	35/50	70	16 y 18 (80%), 16, 18, 6 y 11(20%)
1998	Miguel <i>et al.</i>	CCE	PCR	2/27	8	16
1998	Elamin <i>et al.</i>	CCE	PCR	14/28	50	16(43%), 16, 6(36%), 6(21%)
1998	D'Costa <i>et al.</i>	CCE	PCR	15/100	15	
1998	Koh <i>et al.</i>	CCE	PCR/SB	22/42	52	16(68%), 18 (27.5%), 33(18.5%)
1999	Bustos <i>et al.</i>	CCE CV Melanoma	ISH	9/33	27	16
2002	Kojima <i>et al.</i>	CCE	PCR	35/53	66	38
2003	Sugiyama <i>et al.</i>	CCE	PCR	30/86	35	16

#=número; P=positivos, C=casos; IHQ = Inmunohistoquímica; ISH= hibridación *in situ*; SB= Southern blot hibridación; PCR= reacción en cadena de polimerasa; nd = no determinado; CV= carcinoma verrucoso; CCE= carcinoma de células escamosas

Tabla 3. Resultados de diversos autores en la identificación del VPH en lesiones malignas de la cavidad bucal.⁵

David Esquenazi *et al.*, en Brasil, en el año 2010 ⁴ realizaron un estudio en 100 estudiantes universitarios entre 20 y 31 años de edad, con el objetivo de determinar la frecuencia del VPH en mucosa bucal clínicamente sana. La población estudio no presentó antecedentes de lesiones bucales por el VPH. Las muestras de la mucosa bucal fueron tomadas por cepillado y analizadas mediante la técnica PCR, para lo cual emplearon los primers GP5+/GP6+ y MY09/MY11. Ninguna muestra resultó positiva para el VPH.

Patrícia Rossi do Sacramento *et al.*, también en Brasil, en el año 2006 ⁶ llevaron a cabo un estudio con el objetivo de determinar la prevalencia de VPH en la mucosa orofaríngea aparentemente sana en 50 individuos brasileños. Se tomaron muestras por cepillado de 4 sitios anatómicos; amígdalas palatinas, paladar blando, base de la lengua, y pared posterior de

la faringe; las cuales fueron analizadas por PCR con el empleo de los primers MY09/MY11.

El VPH fue detectado en 9 (5.2%) de las 173 muestras analizadas. La infección por el VPH fue más frecuente en las amígdalas y el paladar blando; es oportuno comentar la probable influencia del grado de queratinización de los tejidos en relación con la susceptibilidad a adquirir la infección por VPH; ya que el tejido queratinizado que caracteriza a ciertos tejidos de la cavidad bucal puede proporcionar una barrera contra la infección por VPH, lo que disminuye la probabilidad de que el virus infecte las células basales de la mucosa.

SITIO	TOTAL DEMUESTRAS	VPH NEGATIVOS % (N)	VPH POSITIVOS % (N)
Amígdalas palatinas	39	20.8 (36)	1.7 (3)
Paladar blando	47	25.4 (44)	1.7 (3)
Base de la lengua	43	23.7 (41)	1.2 (2)
Pared posterior de la faringe	44	24.9 (43)	0.6 (1)
Total	173	94.8 (164)	5.2 (9)

Tabla 4. Detección del VPH en 173 muestras analizadas de sitios orofaríngeos. ⁶

Los tipos de VPH 16 y 61 fueron identificados con más frecuencia, los cuales son clasificados como VPH de alto riesgo.

MUESTRA	SITIO	TIPO DE VPH DE ALTO RIESGO
1	Base de la lengua	18
2	Base de la lengua	52
3	Pared posterior de la faringe	16

4	Paladar blando	52
5	Paladar blando	61
6	Paladar blando	ND
7	Amígdalas palatinas	16
8	Amígdalas palatinas	61
9	Amígdalas palatinas	ND

ND= No detectado

Tabla 5. Sitios orofaríngeos y tipos de VPH identificados en las muestras de VPH positivas.⁶

Algunos autores han realizado estudios para conocer la prevalencia del VPH en neoplasias malignas, utilizando control de individuos con mucosa aparentemente sana.

Luo *et al.*, en Taiwán, en el año 2006³³ realizaron un estudio para determinar la frecuencia y el tipo de VPH presente en OSCC, lesiones precancerosas y mucosa bucal macroscópicamente sana (control). Un total de 51 pacientes con OSCC, 46 pacientes con lesiones precancerosas y 90 con mucosa bucal aparentemente sana. Se realizó la escisión quirúrgica total de las lesiones de los pacientes para realizar el estudio histológico; las muestras citológicas para la detección del VPH fueron obtenidas antes de la cirugía por cepillado de la mucosa de la lesión; de igual manera, las muestras del control se obtuvieron por cepillado. El VPH se identificó con la técnica PCR, para el cual se emplearon los primers MY11, GP5+/GP6+.

El VPH fue identificado en 25.49% de las muestras de OSCC; 30.43% de las muestras de lesiones precancerosas y 13.3% de las muestras control; de las cuales el 9% presentaron VPH de alto riesgo.

TIPO DE VPH	OSCC (n= 51)	LESIÓN PRECANCEROSA (n=46)	CONTROL (n=90)
Todos	13 (25.49%)	14 (30.43%)	12 (13.33%)
Alto riesgo	11 (21.57%)	5 (10.87%)	8 (8.89%)
Bajo riesgo	2 (3.92%)	9 (19.57%)	4 (4.44%)

Tabla 6. Frecuencia del VPH en pacientes con OSCC, con lesiones precancerosas bucales y control.³³

Elaine Smith *et al.*, en Iowa, en el año 2004³² realizaron un estudio con el objetivo de evaluar los factores de riesgo del cáncer de cabeza y cuello relacionados con la infección por VPH. Evaluaron 201 pacientes diagnosticados con cáncer y 333 sujetos control que no presentaran historia de cáncer de cabeza y cuello. Las células exfoliadas de la mucosa bucal de los sujetos de control fueron colectadas por expectoración; para el cual realizaron un lavado vigoroso con un enjuague bucal de 10 ml de solución salina normal.

Se analizaron muestras de células exfoliadas de los sujetos control y tejido tumoral de los pacientes por PCR, con el empleo de los primers MY09/MY11 para detectar el VPH. El 18.3% de las muestras control y el 28.4% de los pacientes con cáncer evaluados fueron positivos para el VPH. En este estudio, el porcentaje de VPH en las células exfoliadas es representativo en relación con el porcentaje de VPH identificado en células tumorales.

RESULTADO	NÚMERO DE CASOS DE PACIENTES (%)	NÚMERO DE CASOS CONTROL (%)
VPH negativo	144 (71.6)	272 (81.7)
VPH positivo	57 (28.4)	61 (18.3)
VPH de bajo riesgo	11 (5.5)	25 (7.5)
VPH de alto riesgo	46 (22.9)	36 (10.8)

Tabla 7. Frecuencia del VPH en muestras de tejido tumoral y control.³²

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por VPH es reconocida como la más frecuente de transmisión sexual.^{9, 17, 20}

Se ha considerado la transmisión a la cavidad bucal a través de la vía materno - fetal; a través de lesiones en la piel de una persona a otra o por autoinoculación,^{4, 9} sin embargo, el principal mecanismo de infección bucal por VPH en los adultos es la práctica de sexo oral^{4, 5, 17, 18} y se ha sugerido la posibilidad de transmisión de las manos a la boca, así como a través de fómites o saliva.^{19, 22}

El VPH ha sido asociado a la presencia de lesiones benignas y malignas bucales, recientemente ha sido reconocido como un factor de riesgo para el carcinoma de células escamosas de la orofaringe. En la literatura se ha reportado la presencia del VPH en mucosa bucal aparentemente sana, sin embargo, los estudios que han sido realizados con variantes en cuanto a las características de la población de estudio, el método y el sitio anatómico de la toma de la muestra, así como la técnica empleada para la detección del virus, presentan resultados discrepantes que van del 0% al 100%.

Pregunta de investigación:

¿Cuál es la prevalencia del VPH en la mucosa bucal aparentemente sana, en una muestra de estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM; y si existe alguna influencia entre la zona anatómica, el método de toma de la muestra y la frecuencia de detección del VPH?

4. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han sugerido que la infección por el VPH de alto riesgo juega un papel etiológico en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; sin embargo estos genotipos han sido identificados en la mucosa bucal clínicamente sana, por lo cual, el análisis de la relación entre la presencia de la infección en forma latente y el desarrollo del cáncer bucal es de vital importancia, ya que la incidencia de cáncer orofaríngeo ha incrementado en población joven no fumadora y que no consume bebidas alcohólicas; lo cual ha sido observado en Estados Unidos y algunas ciudades Europeas.⁸

Las investigaciones realizadas hasta el momento han reportado resultados opuestos en cuanto a la frecuencia de la detección del VPH en la mucosa bucal; cada una de estas investigaciones han presentado variantes en cuanto a las características de la población de estudio, el método y el sitio anatómico de la toma de la muestra, así como la técnica empleada para la detección del virus. Deberán considerarse los siguientes factores que podrán determinar la discrepancia en la frecuencia de la detección del VPH en mucosa bucal: el papel de la queratina como barrera natural de defensa, y el proceso de infección latente; en ambos casos la toma de muestra por cepillado resulta insuficiente para obtener células basales infectadas.

5. HIPÓTESIS

- Si el grado de queratinización de los tejidos de la cavidad bucal varía de acuerdo a la acción mecánica que ejercen, la frecuencia de la detección del VPH depende del sitio anatómico del cual se tome la muestra a analizar.
- Si el VPH permanece en las células basales durante la infección latente; el método de toma de la muestra en la mucosa bucal clínicamente sana que no contienen células basales del tejido, influyen de manera negativa en la frecuencia de la detección del VPH.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del virus de papiloma humano en la mucosa bucal clínicamente sana, en una muestra de estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana, en una muestra de estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM y establecer la relación entre la presencia del virus y los factores de riesgo asociados al mismo.
- Establecer si existe asociación entre el sitio anatómico de la toma de la muestra y la prevalencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana.
- Establecer si existe asociación entre el método de obtención de la muestra y la prevalencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana.

8. METODOLOGÍA

8.1. Tipo de estudio

Se realizará un estudio experimental, transversal en estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM voluntarios para participar en el proyecto de investigación, que sean sometidos a terapéutica quirúrgica en la mucosa bucal en las diferentes áreas odontológicas.

8.2. Población de estudio

Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM.

8.3. Muestra

Se recabarán los resultados de 100 estudiantes de la Facultad de Odontología voluntarios a participar en el proyecto de investigación que requieran procedimientos terapéuticos quirúrgicos en el período comprendido entre enero – junio del 2011.

8.4. Criterios de inclusión

- Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM sistémicamente sanos, voluntarios a participar en el proyecto de investigación.
- Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM que requieran procedimientos quirúrgicos terapéuticos en áreas de la mucosa bucal, en el período comprendido entre enero – junio del 2011.

8.5. Criterios de exclusión

- Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM que no deseen participar voluntariamente en el estudio.
- Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM con enfermedades sistémicas.
- Estudiantes de la Facultad de Odontología de la UNAM que se sometan a terapéutica quirúrgica en un período anterior o posterior al período comprendido entre enero - junio del 2011.

8.6. Variables de estudio

8.6.1. Variable independiente

Las variables independientes que se tomarán en cuenta son las siguientes:

A. Factores de riesgo asociados a la infección por VPH en la cavidad bucal.

- Conducta sexual
 - Preferencias sexuales
 - Inicio de vida sexual activa
 - Número de parejas sexuales
 - Práctica de sexo oral
- Alimentación rica en antioxidantes
- Tabaquismo

B. Zona anatómica de la toma de la muestra

C. Método de la toma de la muestra

8.6.2. Variable dependiente

Frecuencia de la presencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana.

8.7. Método

1. **Encuestas.** Se aplicarán encuestas a la población estudio, con el objetivo de recopilar información acerca de la frecuencia con que se exponen a los diversos factores de riesgo asociados a la presencia del VPH en la cavidad bucal.
2. **Toma de la muestra.** A cada estudiante se le tomarán dos muestras de la mucosa bucal por distintos métodos.

50 estudiantes sometidos a terapéutica quirúrgica en la mucosa bucal revestida por epitelio queratinizado o paraqueratizado.

- a. A cada estudiante se le tomará una muestra por cepillado de la mucosa bucal previa al procedimiento quirúrgico.
- b. Durante el procedimiento quirúrgico terapéutico en la mucosa bucal, a cada estudiante se le tomará una muestra de tejido.

50 estudiantes sometidos a terapéutica quirúrgica en la mucosa bucal revestida por epitelio no queratinizado.

- a. A cada estudiante se le tomará una muestra por cepillado de la mucosa bucal previa al procedimiento quirúrgico.
- b. Durante el procedimiento quirúrgico terapéutico en la mucosa bucal, a cada estudiante se le tomará una muestra de tejido.

<p>Técnica quirúrgica en mucosa bucal revestida por epitelio queratinizado o paraqueratinizado</p>	<p>Técnica quirúrgica en mucosa bucal revestida por epitelio no queratinizado</p>
<p>Zonas anatómicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paladar duro • Encía • Cara dorsal de la lengua <p>Toma de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cepillado • Biopsia 	<p>Zonas anatómicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paladar blando • Mucosa de los labios • Mucosa de los carrillos • Cara ventral de la lengua • Piso de la boca <p>Toma de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cepillado • Biopsia

Tabla 8. Toma de la muestra en la cavidad bucal para detectar VPH.

3. **Almacenamiento de la muestra.** Las muestras obtenidas por cepillado se colocarán en un contenedor con 5 ml de buffer salino de fosfato (PBS) y se mantendrán a -20 °C hasta la extracción del ADN; las muestras de tejido serán colocadas en formalina al 10%.^{16, 25}
4. **Extracción del ADN de la muestra.** La extracción del ADN de las muestras se llevará a cabo siguiendo el protocolo de estudios realizados anteriormente, sin embargo, de ser necesario se procederá a estandarizar la técnica a emplear.
 - a. Muestras por cepillado. La técnica de extracción de ADN que refiere Luo *et al.*, (2006)³³ es la siguiente:

Las células de la muestra se vierten en un tubo Eppendorf que contenga 1 ml de PBS, se somete a centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos a 20 °C. Posteriormente, las muestras se lavan en tres tiempos con PBS, son resuspendidas con una concentración de 10⁶ células por ml en un buffer de proteinasa K (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.5% Twen 20, 400 µg/ml de proteinasa K) y se incuban a 94 °C durante una hora. El lisado es extraído dos veces con fenol: cloroformo (1:1) y precipitado con etanol. El ADN se disuelve en agua destilada estéril.

- b. Muestras de tejido obtenido quirúrgicamente. La técnica para purificación del ADN de las muestras que propone Hashemipour *et al.*, (2010)³⁴ es la siguiente:

El ADN se extrae de secciones de parafina de 5 µM. Las secciones son desparafinadas y colocadas en 200 µL de buffer (50 mM Tris, pH 8.5, 1 mM de EDTA, 0.5% Twen 20) que contenga 200 µg/mL de proteinasa K y se incuban a 37 °C. El lisado es extraído dos veces con fenol: cloroformo (1:1) y precipitado con etanol. El ADN se disuelve en 100 µL TE buffer. La extracción de ADN se mantiene a 4 °C hasta el análisis.

- 5. Análisis de las muestras por PCR.** Se utilizará un control positivo y un control negativo para la ejecución de la técnica PCR; para el control positivo se emplearán los primers PCO3/PCO4, que amplifican 110 pb del gen B-globina.³⁴

PCO3	5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'
PCO4	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

Para realizar el control negativo, se realizará la técnica de PCR sin la presencia de ADN.³⁴

La presencia del ADN del VPH en las muestras se determinará utilizando los primers MY09/MY11 y GP5/GP6, los cuales amplifican fragmentos de la región L1 del VPH de 450 y 150 pb respectivamente.^{4, 6, 34}

Las secuencias de los primers son:^{33, 34}

MY09	5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3'
MY11	5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3'
GP5+	5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC 3'
GP6+	5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA 3'

Para que sea posible identificar la presencia del VPH en infecciones latentes, se emplearán primers que amplifiquen regiones tempranas del mismo, específicamente el gen E1, que se considera es conservado entre los diferentes tipos de virus.⁷

De acuerdo a estudios realizados con anterioridad,^{33, 34, 35, 36} se estandarizarán las concentraciones de cada uno de los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de PCR, así como las condiciones óptimas de tiempo y temperatura a la que se llevarán a cabo cada unos de las etapas del termociclo.

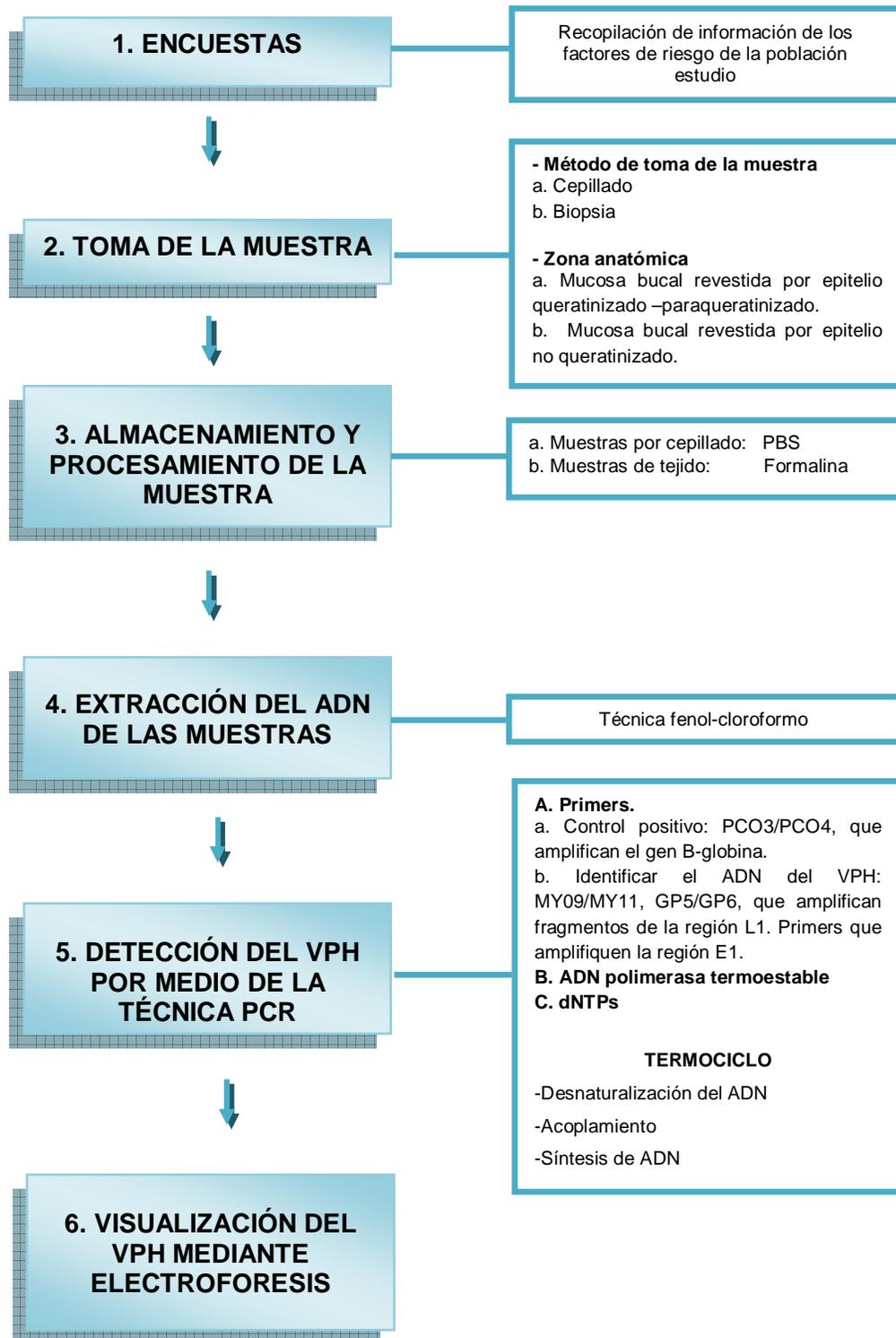
En el libro *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, de Innis Michael A *et al.*, describen las siguientes condiciones del termociclo dependiendo del método de toma de la muestra.

TERMOCICLO	ADN PURIFICADO O PREPARACIÓN FRESCA CLÍNICA, MATERIAL DE INVESTIGACIÓN	ADN PURIFICADO DE LA PREPARACIÓN DEL TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA
DESNATURALIZACIÓN	95 °C 30 segundos	95 °C, 1 minuto
ALINEACIÓN	55 °C, 30 segundos	55 °C, 1 minuto
EXTENSIÓN	72 °C, 1 minuto	72 °C, 2 minutos
NÚMERO DE CICLOS	30 ciclos	40 ciclos

Tabla 9. Condiciones del termociclo para amplificación del VPH por PCR, de acuerdo a la técnica de purificación de ADN.

Visualización de ADN del VPH. Se llevará a cabo mediante electroforesis con gel de agarosa. ¹⁶

DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA



9. DISCUSIÓN

La presencia del VPH en la mucosa bucal clínicamente sana es controversial, ya que las investigaciones realizadas han reportado resultados opuestos; cada una de estas investigaciones han presentado variantes en cuanto a las características de la población de estudio, el método y el sitio anatómico de toma de la muestra, además de la técnica empleada para la detección del virus, factores que pueden determinar la variación en la frecuencia de la detección del VPH en la mucosa bucal.

El epitelio que reviste los tejidos de la cavidad bucal es del tipo plano estratificado, el cual puede ser queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado de acuerdo a la acción mecánica que actúa sobre la mucosa en las diferentes regiones de la cavidad bucal. La mucosa bucal puede dividirse en tres tipos principales: mucosa de revestimiento, que cumple función de protección y se encuentra revestida por epitelio no queratinizado; mucosa masticatoria, que es sometida directamente a fuerza de fricción y presenta revestimiento de epitelio paraqueratinizado o queratinizado; y mucosa especializada que tiene función sensitiva destinada a la recepción de los estímulos gustativos.³⁷ La queratina actúa como una barrera protectora de la mucosa, de tal manera que puede impedir o disminuir la probabilidad de que el virus infecte las células basales de la mucosa bucal queratinizada o paraqueratinizada. Patrícia Rossi do Sacramento *et al.*, en Brasil, en el año 2006⁶ al evaluar 173 muestras de 4 sitios anatómicos; amígdalas palatinas, paladar blando, base de la lengua, y pared posterior de la faringe con el objetivo de determinar la presencia del VPH por PCR, identificó el virus con mayor frecuencia en las zonas anatómicas revestidas por epitelio no queratinizado, ya que 7 de las 9 muestras positivas para el VPH se localizan en estas áreas (amígdalas palatinas, paladar blando y pared posterior de la faringe); en comparación con la zona anatómica revestida por epitelio

queratinizado (base de la lengua) en las que se identificó el virus en 2 muestras; lo cual puede sugerir la relación entre la susceptibilidad a adquirir la infección por VPH y el revestimiento epitelial.

Por otro lado, los estudios realizados con el objetivo de relacionar la presencia del VPH en la mucosa bucal y genital, obtuvieron que el VPH se encuentra con mayor frecuencia en la mucosa genital que en la mucosa bucal. Smith *et al.*, en Iowa, en el año 2004²⁴ identificaron el VPH en 29% de las muestras del cuello uterino, en contraste con 2.4% en cavidad bucal; por su parte, Galvão Castro *et al.*, en Brasil, en el año 2009¹⁸ al evaluar mujeres con infección por VPH genital concluyeron que el 57% de los casos resultaron positivos para las muestras genitales; mientras que el 100% de las muestras de la cavidad bucal fueron negativas. La discrepancia en la frecuencia del VPH en la mucosa genital y bucal puede asociarse con el tipo de revestimiento epitelial en estas áreas anatómicas, ya que el epitelio de revestimiento corresponde al tipo no queratinizado y queratinizado respectivamente.

El método de toma de la muestra para la detección del VPH en la mucosa clínicamente sana resulta cuestionable al considerar las características del proceso de infección latente o subclínica y el tropismo del virus por las células epiteliales basales. Al obtener la muestra por los métodos de citología y enjuague de la mucosa bucal se obtienen células epiteliales superficiales, en las cuales sería posible detectar la presencia del virus en infecciones subclínicas, ya que la infección es productiva; sin embargo, para detectar el VPH en infecciones latentes puede resultar significativo que el método de toma de la muestra en la mucosa clínicamente sana incluya células del estrato basal, ya que el ADN viral permanece en el núcleo de las células basales como episoma en la infección latente, además de constituir las células blanco del VPH.

En los estudios realizados con el objetivo de detectar el VPH en la mucosa bucal clínicamente sana, se han empleado diversos métodos de toma de las muestras (cepillado, biopsia y lavado), así como distintas técnicas de detección del virus (hibridación, PCR y Southern blot). De acuerdo a los datos recopilados en la tabla 2, la frecuencia del VPH en la cavidad bucal revela las siguientes variaciones: en las muestras obtenidas por biopsia, el VPH varía de 41.6% identificado con la técnica de hibridación (Maitland *et al.*, 1987) a 0% con la técnica PCR (Cruz *et al.*, 1996; Sand *et al.*, 2000); por su parte, al emplear el método de toma de muestra por cepillado, el porcentaje del VPH varía del 100% (Terai *et al.*, 1999) al 9% (Schwartz *et al.*, 1998) ambas analizadas con la técnica PCR; finalmente, en las muestras colectadas por enjuague bucal, el virus se ha identificado de 10.8% (Smith *et al.*, 2004) a 4.8% (Smith *et al.*, 1998) ambas mediante PCR.

Tres estudios realizados en Brasil, los cuales obtuvieron las muestras por cepillado, concluyen que el VPH es identificado en la cavidad bucal en un porcentaje nulo o muy bajo. Galvão Castro *et al.*, en el año 2009;¹⁸ así como David Esquenazi *et al.*, en el año 2010,⁴ al analizar muestras de la mucosa bucal obtenidas por cepillado con la técnica PCR, revelan un 0% de frecuencia del VPH. Por su parte, Patrícia Rossi do Sacramento *et al.*, en el año 2006⁶ indican que el VPH resultó positivo en 5.2% de las muestras de la mucosa orofaríngea obtenidas por cepillado.

Luo *et al.*, en Taiwán, en el año 2006³³ identificaron el VPH por PCR en 25.49% de las lesiones de OSCC; 30.43% en lesiones precancerosas y 13.3% en mucosa bucal clínicamente sana de las muestras control, las cuales se obtuvieron por cepillado de la mucosa de la lesión y de la mucosa clínicamente sana del control. El VPH se detectó con mayor frecuencia en las muestras de las lesiones cancerosas y precancerosas; se debe considerar la posibilidad de que la fase de la infección influya en los resultados, ya que en

las lesiones se trata de una infección productiva, en las que la detección del virus en las capas superficiales del epitelio aumenta; sin embargo, en una infección latente como en la mucosa clínicamente sana, esta posibilidad decrece, debido a la presencia del virus principalmente en las células basales.

Por otro lado, determinados estudios revelan mayor porcentaje del VPH en muestras tomadas por biopsia; Elaine Smith *et al.*, en Iowa, en el año 2004³² detectaron el VPH por PCR en 28.4% en tejido tumoral de pacientes diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello, y en 18.3% de las muestras de células exfoliadas por enjuague bucal del los sujetos control. En este estudio el porcentaje del VPH detectado por medio del análisis de tejido es mayor que el detectado por análisis de las células exfoliadas por enjuague bucal, sin embargo es evidente que debe considerarse que las muestras analizadas provienen de tejidos en distintas condiciones clínicas.

Xavier *et al.*, en Brasil, en el año 2009²⁵ tomaron dos tipos de muestras para identificar el VPH en la mucosa bucal: raspado en el 90% de los pacientes que presentaron mucosa bucal aparentemente sana y biopsia en el 10% de los pacientes presentaron lesiones orales. El VPH en la mucosa bucal fue identificado en el 3.3% de las muestras, la cual corresponde a la obtenida por biopsia. Es posible considerar el método de toma de la muestra, así como el proceso de infección que se mencionó anteriormente; adicionalmente, la población estudiada (30) así como el número de muestras obtenidas por biopsia (3) resultan poco representativas epidemiológicamente.

PCR es la técnica de detección del VPH más sensible, sin embargo existen variaciones del 100% (Tominaga *et al.*, 1996; Terai *et al.*, 1999) al 0% (Eike *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 1996; Mao *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 1996; Sand *et al.*, 2000) en la detección del virus en la mucosa bucal clínicamente sana.

Del mismo modo, con el empleo de otras técnicas de detección del virus se han revelado discrepancias; con la técnica hibridación *in situ*, la frecuencia del VPH oscila del 0% (Pillai *et al.*, 1999; Surgyama *et al.*, 2003) al 41.6% (Maitland *et al.*, 1987); al emplear la técnica Southern blot el porcentaje de detección del virus va del 0% (Tominaga *et al.*, 1996) al 15.6% (Kellokoski *et al.*, 1992).

Tominaga *et al.*, en el año 1993, al analizar 3 muestras por PCR y Southern blot, detectó el VPH en el 100% de las muestras con la técnica de PCR, en contraste, al utilizar la técnica de Southern blot todas las muestras resultaron negativas para el VPH; lo cual sugiere un mayor sensibilidad de la técnica de PCR para la detección del ADN viral, sin embargo, el número de muestras analizadas es muy reducida.

Otra variante a considerar en los estudios realizados es el número de muestras analizadas por PCR, por ejemplo Tominaga *et al.*, analizaron 3 muestras, de las cuales el 100% resultaron positivas para el VPH, en cambio, Schwartz *et al.*, al analizar 435 muestras detectó el VPH en el 9% de las mismas; cabe mencionar la importancia de las características de la población de estudio, las cuales influyen de manera determinante en la frecuencia de detección del mismo, así como las variables mencionadas anteriormente.

Independientemente del método de toma de la muestra, los estudios realizados (PCR) han empleado los primers consenso MY09/MY11 y/o GP5/GP6, que amplifican los fragmentos de la región L1 del VPH de 450 y 150 pb respectivamente, ya que este gen se encuentra altamente conservado entre los distintos tipos de virus; sin embargo la región L1 sólo se codifica al diferenciarse las células epiteliales, por lo tanto para amplificar el ADN viral en infecciones latentes puede resultar significativo emplear primers que amplifiquen las secuencias de nucleótidos de las proteínas tempranas

del virus, que son codificadas en la capa basal del epitelio. Si el virus se encuentra de manera latente en las capas basales del epitelio, con los primers MY09/MY11 y/o GP5/GP6 no es posible identificar el virus. Según el libro Microbiología, Bacteriología y Virología,⁷ el gen E1 es el más conservado entre los diferentes tipos de VPH; por esta característica es necesario realizar la técnica por PCR empleando primers que amplifiquen la región E1 del virus.

Los genotipos de VPH de alto riesgo, en particular el VPH-16 y 18 han sido relacionados con la patogénesis del cáncer de la cavidad bucal y la orofaringe, en particular el VPH-16 ha sido identificado en el 90% de los VPH asociados con cáncer de cabeza y cuello, y en el 50% de CCOS;¹⁰ sin embargo los genotipos detectados en la mucosa bucal clínicamente sana frecuentemente corresponden a VPH de alto riesgo. De acuerdo a los datos recopilados en las tablas 1 y 2, se detectaron genotipos del VPH de alto riesgo en la mucosa clínicamente sana en el 94% de los estudios con resultados positivos para el VPH; de los cuales, 47% incluyó más de un tipo de VPH de alto y bajo riesgo (VPH-16, 18, 31, 33, 6, 11), 42% presentó VPH-16 únicamente y 5% correspondió a VPH-18 únicamente.

Luo *et al.*,³³ identificaron el VPH en 25.49% en lesiones de OSCC; 30.43% en lesiones precancerosas y 13.3% en mucosa bucal clínicamente sana de las muestras control, de los cuales el 8.89% corresponde a VPH de alto riesgo y 4.44% a VPH de bajo riesgo; por su parte, Elaine Smith *et al.*,³² identificó el VPH en los pacientes diagnosticados con cáncer en 28.4% de los muestras y en 18.3% de las muestras de mucosa bucal clínicamente sana; de las cuales el 10.8% corresponden a genotipos de VPH de alto riesgo y 7.5% a VPH de bajo riesgo. De acuerdo a la frecuencia del virus detectado en las células tumorales, el porcentaje del VPH en la mucosa bucal

clínicamente sana es representativo; así mismo y el porcentaje de genotipos de alto riesgo en mucosa clínicamente sana es mayor que el de bajo riesgo. Patrícia Rossi do Sacramento *et al.*,⁶ identificaron el VPH en 5.2% de las muestras de orofaringe clínicamente sana analizadas; de las cuales el 77% corresponden a genotipos de VPH de alto riesgo y en el 33% no se identificaron los genotipos.

La asociación entre los factores de riesgo para el VPH y la frecuencia de la infección en la cavidad bucal difieren en los diversos estudios, sin embargo debe considerarse las características de la población estudio, lo cual conlleva a éstas discrepancias en los resultados. Un ejemplo claro es el estudio realizado por D' Souza *et al.*, en Estados Unidos, en el año 2009¹⁷ en el que concluyeron resultados distintos al evaluar individuos de 19 y 57 años de edad promedio, el VPH en la cavidad bucal fue detectado en 2.9% y 4.8% respectivamente. Cada grupo de individuos presentó características epidemiológicas evidentemente distintas, en las cuales se basan las conclusiones del estudio.

Finalmente, es relevante mencionar que la recopilación de información se lleva a cabo por medio de encuestas a la población estudio, y la imposibilidad confirmar la veracidad de los datos recabados en las mismas.

10. CONCLUSIONES

El estudio de la presencia del VPH en la mucosa clínicamente sana es de vital importancia para determinar el papel que juega el virus en el desarrollo de distintas patologías, especialmente al conocer el potencial oncogénico del mismo. Debido a las discrepancias en los resultados de los estudios realizados, resulta trascendente llevar a cabo este proyecto de investigación que evaluará las variables en la metodología que se considera repercuten en los resultados; como son la relación entre la susceptibilidad para la infección del VPH y el tipo de epitelio de revestimiento de los tejidos de la mucosa bucal; la influencia del método de toma de la muestra y el empleo simultáneo de primers que amplifiquen secuencias de nucleótidos de las regiones tempranas y tardías del VPH al analizar las muestras por PCR, que es considerada la técnica de detección del VPH más sensible.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Molina J, Manjarrez MA, Tay J. Microbiología, Bacteriología y Virología. 1ª.ed. México: Méndez Editores, 2010. Pp. 768-792.
2. Arango MP. El virus del Papiloma Humano. Arch. de Med 2005; (10): 29-33.
3. Consuegra CP, Molina D, Egea E, Garavito G. El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. Salud Uninorte 2004; 19: 3-13.
4. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho M, Barros F. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. Braz J Otorhinolaryngol 2010; 76(1):78-84.
5. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. Braz J Otorhinolaryngol 2006; 72(2): 272-82.
6. Do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, Pereira JS, Pereira F, Villa LL, Rahal P. The Prevalence of Human Papillomavirus in the Oropharynx in Healthy Individuals in a Brazilian Population. J Med Virol 2006; 78: 614–618.

7. Limogni L, Pérez C, Jliménez C. Prevalencia de la infección por virus papiloma humano en la cavidad bucal en pacientes pediátricos. *Acta odontol. venez* 2006; 44(2): 277-283.
8. Vidal L, Guillison ML. Human Papillomavirus in HNSCC: Recognition of a Distinct Disease Type. *Hematol Oncol Clin N Am* 2008; 22: 1125-1142.
9. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer* 2009; 4:16.
10. Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Kovacs K, Heller H, Schmitt C, Volek J, Szendy M, Bollmann R, Hildenbrand R. The prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in oral epithelial hyperplasia: proposal of a concept. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 181-187.
11. García A, Falcoff N, Di Camillo N, Sartor B, Catanese M, Denninghoff V. Inmunohistoquímica de la proteína p16ink4a en biopsias y extendidos cervicovaginales y su relación con HPV por PCR. *MEDICINA* 2008; 68: 428-432.
12. Genesser F. *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ª. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2003. Pp. 32-49.
13. Bruce A, Johnson A. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª. ed. Barcelona: Ediciones Mega, 2003. Pp.491-513.

14. Berg JM, Tymoczko JL. Bioquímica. 5a. ed. España: editorial Reverté, 2003. Pp. 103-105, 144-151.
15. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning a laboratory manual. 3a. ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Pp. 1-20.
16. Innis MA, Gelfand D, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. 1a. ed. California: Academic Pressinc, 1990. Pp. 3-19, 146-158, 356-366.
17. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Guillison ML. Oral Sexual Behaviors Associated with Prevalent Oral Human Papillomavirus Infection. J Infect Dis 2009; 199(9): 1263-9.
18. Castro TM, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. Bras. J Otorrinolaringol 2009; 75(2): 167-71.
19. Rintala M , Grénman S, Puranen M , Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: A prospective Finnish HPV Family Study. J Clin Virol 2006; 35: 89–94.
20. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. Vaccine 2006; 24: S1-15.
21. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk

Factors in a Cohort of female University Students Am J Epidemiol 2003; 157: 218-226.

22. Jiménez C. Estudio Clínico - Patológico Retrospectivo de Papiloma de la Mucosa Bucal en una población venezolana. Acta odontol. venez 2002; 40(1): 31-35.
23. Ault KA. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. Infect Dis Obstet Gynecol 2006; Article ID 40470:1-5.
24. Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP, Haugen TH. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. Infect Dis Obstet Gynecol 2004; 12: 45-56.
25. Xavier SD, Bussoloti Filho I, Máximo J, Castro TM, Framil VM, Syrjänen KJ. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in oral mucosa of men with anogenital HPV infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108(5):732-7.
26. Siegel EM, Salemi JL, Villa LL, Ferenczy A, Franco EL, Giuliano AR. Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. Gynecol Oncol 2010; 118: 289-294.
27. Figuero E, Carretero MA, Cerero R, Esparza G, Moreno LA. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. Med Oral 2004; 9:14-23.

28. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV Infection among Men: A Systematic Review of the Literature. *J Infect Dis* 2006; 194(8):1044-57.
29. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med* 2006; 354(25): 2645-54.
30. Saini R, Khim TP, Rahman SA, Ismail M, Tang T. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. *Virology J* 2010; 7:131.
31. Ravi Mehrotra, Ajay Kumar Chaudhary, Shruti Pandya, Sharmistha Debnath, Mangal Singh, Mamta Sing. Correlation of addictive factors, human papilloma virus infection and histopathology of oral submucous fibrosis, *J Oral Pathol Med* 2010 39: 460-464.
32. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human Papillomavirus in Oral Exfoliated Cells and Risk of Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6): 449-55.
33. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *Int J Oral Maxillofac* 2007; 36: 153-158.

34. Hashemipour MA, Shoryabi A, Adhami S, Mehrabizadeh Honarmand H. Extensive Focal Hyperplasia. Arch Iran Med 2010; 13 (1): 48-52.
35. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. J Med Microbiol 2004; 53: 125-128.
36. Rintala MA, Pöllänen PP, Nikkanen VP, Grénman SE, Syrjänen SM. Human Papillomavirus DNA Is Found in the Vas Deferens. J Infect Dis 2002; 185(11):1664-7.
37. Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª. ed. México: Editorial Panamericana, 2002. Pp. 113-146.
38. Chan PK, Ho WC, Wong MC, Chang AR, Chor J, Mei-Yung Yu, Epidemiologic Risk Profile of Infection With Different Groups of Human Papillomaviruses. J Med Virol 2009; 81:1635-1644.