

Implicaciones de los papilomavirus humanos en la etiología del cáncer bucal

Pleguezuelos E*, Alaejos C**, Berini L***, Gay Escoda C****

RESUMEN

Dados los avances recientes en la investigación virológica y clínica hoy se reconoce al papilomavirus como uno de los patógenos humanos más importante. La reciente avalancha de conocimientos sobre los papilomavirus humanos se ha obtenido gracias al desarrollo de la tecnología relacionada con el ADN recombinante e ingeniería genética que ha permitido la replicación y caracterización del genoma de los papilomavirus, así como el estudio de la expresión de los genes virales. En los últimos años se han puesto de manifiesto algunos hechos que implican desde el punto de vista etiológico la infección por papilomavirus con el desarrollo de neoplasias intraepiteliales y carcinomas de células escamosas, particularmente en el tracto genital y el tracto aerodigestivo superior. Estos datos se derivan de estudios epidemiológicos, observaciones clínicas y estudios de biología molecular.

Palabras Clave: Papilomavirus, cáncer bucal.

SUMMARY

Investigations about the aetiology of oral cancer and its relation with human papillomaviruses have been recently increased due the great development of new technologies related to DNA and genetic engineering wich have permitted replication and identification of papillomaviruses genoma and also the study of viral gene expression. Human papillomaviruses have been associated with intraepithelial neoplasms and squamous cell carcinomas, especially with carcinoma of the cervix and the upper aerodigestive tract. These assumptions come from epidemiological data, clinical data and molecular biologic methods.

Key words: Papillomaviruses, oral cancer.

Aceptado para publicación: Abril 1996.

* Odontóloga.Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona

** Odontóloga.Licenciada en Medicina y Cirugía.Alumna del Máster de Cirugía e Implantología Bucal.Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona.

*** Profesor Titular de Patología Quirúrgica Bucal y Maxilofacial.Profesor del Máster de Cirugía e Implantología Bucal.Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona.

**** Catedrático de Patología Quirúrgica Bucal y Maxilofacial.Director del Máster de Cirugía e Implantología Bucal.Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona.Cirujano Maxilofacial del Centro Médico Teknon de Barcelona.

Pleguezuelos E, Alaejos C, Berini C, Gay Escoda C. Implicaciones de los papilomavirus humanos en la etiología del cáncer bucal. *Av Odontoestomatol* 1998; 14: 57-64.

INTRODUCCIÓN

Los papilomavirus son un grupo heterogéneo de virus ADN, algunos de los cuales tienen una especificidad remarcable al huésped y a la célula elegida como blanco. Se encuentran predominantemente en epitelios escamosos. Dichos virus causan en el hombre y en un amplio grupo de animales hiperplasias, papilomas y lesiones epiteliales escamoverrucosas en la piel y en varias zonas mucosas(1,2). En el hombre se han podido demostrar lesiones producidas por papilomavirus humanos (HPV) en diversos lugares de la anatomía. Es frecuente encontrarlas en el tracto anogenital, uretra, piel, laringe, mucosa traqueobronquial, cavidad nasal y senos paranasales, boca, esófago y conjuntiva(1,2).

La mayoría de HPV demuestran poseer un sitio relativamente específico de infección en el cuerpo humano(2); y dentro de cada grupo o clase de lesiones, los distintos patrones histológicos pueden ser asignados, de manera específica, a los correspondientes tipos de HPV(3).

El papel de los HPV en una variedad de lesiones bucales benignas (papiloma, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal, liquen plano), lesiones precancerosas (displasia y leucoplasia), y algunos carcinomas de células escamosas ha sido demostrada por estudios histopatológicos, ultraestructurales, inmunohistoquímicos, hibridación y amplificación del ADN (2,4,5). También se ha demostrado la presencia de ADN de HPV en un queratoma odontogénico(6), en ameloblastomas(7,8) y en un nevus blanco esponjoso(9).

Estos virus contribuyen a la proliferación de las células basales de los epitelios escamosos infectados(10).

Este posible papel etiológico de la infección por HPV en la patogénesis del precáncer y cáncer bucal ha sido apoyado por el descubrimiento de lesiones sugestivas de HPV en especímenes de cáncer bucal así como por estudios de hibridación que revelan ADN de HPV tipos 2,11,16 y 18(1,2).

Los HPV son capaces de residir de forma latente largos períodos de tiempo en la célula huésped. Tienen bajo grado de patogenicidad, pero su efecto sinérgico con otros carcinógenos, como el tabaco y el alcohol, puede potenciar su poder carcinógeno(11).

Los HPV tienen un tropismo por los tejidos que infectan y una gran variedad en el potencial oncogénico. Comparten una organización genética similar y dependen de la diferenciación terminal del epitelio para completar su ciclo viral. La replicación del ADN y la transcripción aumentan con la diferenciación celular. La expresión de las proteínas tardías y el subsiguiente ensamblaje del virión está restringido a las células más diferenciadas, las superficiales(11).

CONCEPTO

Los papilomavirus son un conjunto de virus con una doble cadena de ADN. Los HPV se han clasificado en el pasado en dos grupos, los que están asociados con lesiones mucosas y los que se encuentran principalmente en lesiones cutáneas. Aparte de los HPV 1,3,4,7 y unos pocos HPV raros, la mayoría de los HPV relacionados con lesiones de la piel han sido descritos y aislados en pacientes con una enfermedad poco frecuente, la epidermodisplasia verruciforme. De estos HPV, los tipos 5 y 8(y en menor grado los HPV 14,17,20) se han asociado con carcinomas de células escamosas desarrollados en estos pacientes normalmente en zonas expuestas a la luz solar. Otro tipo de HPV asociado con carcinoma de células escamosas es el HPV 41(12).

Los HPV asociados predominantemente con lesiones mucosas incluyen los encontrados en lesiones benignas y malignas del tracto genital. De estos, algunos son hallados principalmente en lesiones malignas, como los HPV 16 y 18, por ello se denominan de "alto riesgo" u oncogénicos. Mientras que otros se encuentran comúnmente en lesiones benignas, como los HPV 6,11,42; son los HPV de "bajo riesgo"(13).

ESTRUCTURA VIRAL

Las partículas de papilomavirus, aisladas de conejos, ciervos, ganado vacuno o humanos infectados, son similares en cuanto a su apariencia. El virión consiste en un "core" central de ADN enclaustrado dentro de una cápside de proteína viral externa. La cápside está compuesta de 72 subunidades (capsómeros), distribuidos en un patrón icosaédrico simétrico que da al virus un aspecto esférico en el examen con microscopio electrónico(1,2). Este virus se replica en el núcleo de las células epitelia-

les escamosas(5).

El análisis bioquímico de la cápside viral ha demostrado la existencia de dos familias distintas de proteínas estructurales: una proteína menor cuyo peso molecular es de 54.000 daltons y una mayor de 76.000 daltons. Las proteínas mayores de la cápside cuando se desnaturalizan tienen una alta reactividad cruzada y sirven como antígenos tipo específicos de género. Por el contrario las proteínas menores de la cápside parecen ser altamente tipo específicas y podrían ser utilizadas para la tipificación inmunohistoquímica de las infecciones por HPV(1,2).

La inmunización con partículas virales íntegras produce un anticuerpo de reacción cruzada con todos los virus del papiloma humano y de animales. Se supone que este llamado anticuerpo específico de grupo reconoce un sitio antigénico normalmente oculto dentro de la estructura viral por rotura de ésta. Se ha utilizado el anticuerpo en tinciones inmunohistoquímicas para estudiar la presencia de la proteína principal de la cápside en muestras de biopsia(15).

La ausencia de antígenos de HPV no significa que el HPV no esté presente, los antígenos sólo son expresados donde la diferenciación epitelial queratínica esté en un estado apropiado(15).

IDENTIFICACION DE LAS INFECCIONES POR HPV EN LA CAVIDAD BUCAL

La identificación de las infecciones por HPV se realiza con distintos métodos:

1- Apariencia macroscópica: Los condilomas acuminados y los papilomas de la cavidad bucal son fácilmente identificables a simple vista.

Sin embargo, la apariencia macroscópica no sirve para el diagnóstico de infecciones por HPV latentes subclínicas, así como en lesiones por HPV planas. Las lesiones planas del tracto genital se pueden visualizar aplicando ácido acético. Esta técnica también se ha utilizado en la cavidad bucal, sin embargo, la especificidad de esta técnica en la cavidad bucal es controvertida ya que muchas infecciones no relacionadas con HPV dan una reacción similar.

2- Microscopio óptico: Los HPV causan proliferaciones epiteliales o fibroepiteliales caracterizadas por un espesamiento epitelial, gránulos de queratohialina prominentes en la capa granular, acantosis e hiperqueratosis y/o papilomatosis. Los cambios morfológicos patognomónicos de la infección por HPV son los coilocitos o células en balón que aparecen comúnmente en las capas superficiales e intermedias del epitelio. Son células hiper cromáticas con un núcleo ligeramente irregular rodeado por una zona clara citoplasmática(16). Sin embargo, el examen rutinario al microscopio no puede identificar el tipo específico de HPV que infecta aquellas lesiones que muestran cambios morfológicos inducidos por el virus, y tiene poco valor en la identificación de regiones de tejido con transformación neoplásica asociada al HPV(13).

3- Microscopio electrónico: La presencia de inclusiones intranucleares basofílicas en el estrato granuloso en lesiones epiteliales asociadas a HPV se correlaciona con la presencia de partículas de HPV reveladas por el microscopio electrónico. La replicación del ADN viral depende de factores específicos como la diferenciación queratinocítica, así las cápsides maduras sólo se detectan en el núcleo de algunas de las células coilocíticas y disqueratósicas. El fracaso de la detección de HPV por el microscopio electrónico, no necesariamente excluye su presencia(13).

4- Inmunohistoquímica: Se pueden utilizar secciones congeladas de biopsias de tejidos bucales fijadas rutinariamente y frotis citológicos(2). Aunque los antígenos de la cápside de los HPV pueden ser detectados en las células y secciones de tejidos utilizando antisuero contra el antígeno específico de género, este método no distingue los tipos virales, y el antígeno puede no estar expresado en todas las lesiones o tumores asociados con HPV(17); los antígenos se expresan sólo donde la diferenciación queratínica está en un apropiado estadio de desarrollo(13). El método inmunohistoquímico de peroxidasa-antiperoxidasa permite localizar los antígenos virales en las capas superficiales de la proliferación epitelial(18).

5- Hibridación de los ácidos nucleicos: Los análisis de hibridación de los ácidos nucleicos son un método preciso para detectar las infecciones por HPV. Las sondas moleculares son fragmentos de cadena sencilla de ácido nucleico que se marcan normalmente con un radioisóto-

po, biotina, o un compuesto fluorescente. Estas secuencias de nucleótidos se unen complementariamente a hebras únicas de ADN de procedencia viral, o de células humanas de manera altamente específica. Una vez que el segmento de ADN se hibrida con el ADN viral, las partículas virales pueden ser localizadas por una reacción con enzima marcada(19,20). Las principales técnicas de hibridación utilizadas son:hibridación Southern Blot,hibridación Dot Blot e hibridación in situ.

6- Reacción de la polimerasa(PCR): Se basa en la amplificación enzimática de genes "in vitro".Permite detectar cantidades mínimas de ADN. Se sintetizan químicamente series de oligonucleótidos y se utilizan para amplificación selectiva de una parte específica del genoma del HPV. Con esta técnica puede aumentarse más de cien veces la sensibilidad de detección de HPV en comparación con las otras técnicas(21).

PAPEL DEL HPV EN EL CANCER BUCAL

El posible papel de la infección por HPV en la etiología de las leucoplasias bucales y del cáncer bucal no fue apreciado hasta 1983, cuando Syrjänen y cols.(4) describieron cambios citopáticos de HPV (coilocitosis) en cánceres bucales idénticos a aquellos previamente encontrados en lesiones precancerosas y carcinomas de cérvix uterino. Estos hallazgos morfológicos fueron más tarde confirmados por demostración inmunohistoquímica de los antígenos de la cápside de HPV en estas lesiones.

El posible papel de la infección de HPV en la etiología del cáncer bucal está apoyado por estudios directos del material tumoral y por estudios de immortalización y transformación "in vitro":

- Los miembros del grupo del papilomavirus producen tumores en la animales de experimentación(1)
- Son muy frecuentes las infecciones por papilomavirus en el aparato genital y bucal(1)
- Algunas de las lesiones benignas inducidas por papilomavirus tienen elevada tendencia a conversión maligna, en particular bajo el efecto de carcinógenos químicos y físicos(2)

TABLA 1.- Tipos de HPV específicos de las lesiones mucosas bucales.

| <i>LESION HISTOPATOLOGICA</i> | <i>GENOTIPO DE HPV</i> |
|--------------------------------|------------------------|
| Condiloma acuminado | 2,6,11,16 |
| Displasia epitelial | 6,11,16,18 |
| Hiperplasia epitelial focal | 13,32 |
| Liquen plano | 16 |
| Leucoplasia vellosa | 16,18 |
| Hiperplasia papilar | 6,11,13,16 |
| Papiloma escamoso | 2,6,11,16 |
| Carcinoma de células escamosas | |
| 2,3,11,16,18,57 | |
| Hiperplasia verrucosa | 16 |
| Verruga vulgar | 2,4,6,7,16 |
| Carcinoma verrucoso | 2,6,11 |

- Existe una asociación constante del mismo tipo de ADN de HPV en metástasis de carcinomas primarios que contienen HPV. El ADN de HPV ha sido detectado por PCR en nódulos linfáticos de drenaje de tumores primarios HPV positivos, y se ha sugerido que el ADN del HPV puede ser un marcador tumoral útil(22). El mantenimiento constante del ADN de los HPV en metástasis de tumores primarios HPV positivos apoya la hipótesis de que los HPV son cofactores en la patogénesis de algunos carcinomas(23).
- Se encuentran genomas de HPV no sólo en tumores primarios y metástasis, sino también en líneas celulares que se establecen a partir de las biopsias(2).
- El ADN viral se transcribe de manera activa dentro de las células tumorales y se han detectado proteínas no estructurales de HPV(tempranas) por diferentes técnicas como inmunoprecipitación o "Western Blot"(2).

Tipos de HPV en la cavidad bucal

Aunque en la actualidad se han aislado más de 70 tipos diferentes de papilomavirus, al parecer sólo ciertos genotipos tienen especial predilección por ubicarse en

los epitelios escamosos de la cavidad bucal. Los tipos 1,2,4,6,7,11,13,16,18,30,32 y 57 han sido encontrados en los diferentes tipos de lesiones bucales (2,24-26), como vemos esquematizado en la tabla 1. De estos, los tipos 13 y 32 parecen estar exclusivamente confinados a lesiones bucales específicas (hiperplasia epitelial focal) (24,27-29). El ADN del HPV 7 fue el más comúnmente encontrado en verrugas bucales en individuos inmunodeficientes seropositivos al HIV (26).

Más del 30-40% de especímenes de biopsias de cáncer bucal contienen ADN viral (30), y el 60% de tumores bucales contienen el ADN de los HPV 16 y 18 (31).

Se sabe que los HPV 6 y 11 se encuentran predominantemente en lesiones bucales benignas y los tipos 16 y 18 en carcinomas epidermoides (1).

Sin embargo esta división en grupos de "alto y bajo riesgo" no es tan clara ya que algunas lesiones displásicas pueden contener ADN de los HPV 6 y 11. Esto puede indicar que también los tipos de "bajo riesgo" pueden poseer un potencial para la progresión maligna (4). En algunos estudios se ha encontrado el ADN de los tipos 2 y 11 en carcinomas bucales (32).

Estado del genoma viral y relación con transformación maligna

Se ha sugerido que la integración del ADN del HPV dentro de los cromosomas de las células huésped puede jugar un papel en el desarrollo de la malignidad ya que en las lesiones benignas el ADN del HPV está presente casi exclusivamente con episomas libres monoméricos u oligoméricos, pero la mayoría de líneas celulares derivadas de carcinomas contienen genomas de HPV 16 o 18 integrados. El suceso de la integración causa interrupciones y deleciones dentro de los genes virales.

Prevalencia de ADN de HPV en tejidos normales, precancerosos y cáncer bucal

Desde que comenzaron a aplicarse las técnicas de recombinación de ácidos nucleicos al estudio de la patología viral se han puesto de manifiesto evidencias que relacionan los distintos grupos de HPV con lesiones premalignas y malignas.

El problema de conocer la prevalencia de los HPV y su papel en el desarrollo de la enfermedad neoplásica parte del hecho de que los HPV están presentes en un bajo número de copias en el carcinoma de células escamosas y los datos de prevalencia se basan en técnicas moleculares con diferente sensibilidad y especificidad para la detección viral. La interpretación de los datos se complica por el hecho de que existen variaciones significativas en los protocolos de los diferentes laboratorios y en las sondas de HPV utilizadas. Muchos estudios también se han basado en muestras pequeñas. Existen también diferencias en las poblaciones estudiadas y variabilidad en los métodos de detección (1,33). Además se han realizado pocos estudios que comparan la prevalencia de HPV en especímenes neoplásicos con la encontrada en tejidos normales (34,35).

Diversos estudios han puesto de manifiesto por técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y de amplificación de las cadenas de polimerasa (PCR), las distintas frecuencias con que aparecen HPV en lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal y que ya han sido comentadas.

Actividad transformadora del HPV "in vitro"

La mayoría de la información relatando el potencial oncogénico de los HPV se ha generado a partir de estudios sobre carcinoma de cérvix (36).

Después de la infección el virus permanece latente o experimenta una replicación activa que resulta en la síntesis de virus infeccioso. Bajo ciertas circunstancias, el ADN viral se puede integrar en el genoma de la célula huésped. La integración generalmente ocurre en las regiones del genoma viral E1/E2 resultando en el fallo de la transcripción de los genes tardíos y posiblemente en la transcripción incontrolada de los genes tempranos E6 y E7; estos genes codifican proteínas que están involucradas en la regulación del crecimiento viral (36). La actividad biológica de las proteínas tempranas del HPV 16 y 18 ha sido demostrada por ensayos de transformación en células en cultivo y en ratones transgénicos (21).

Se ha demostrado en diferentes estudios (21,24,36-41) que los productos de los genes E6 y E7 del HPV 16:

- Son sustancias oncogénicas.

- Están asociados con la inmortalización de los queratinocitos humanos.
- Cooperan con otras oncoproteínas citoplasmáticas para transformar células primarias.
- Inducen la síntesis de ADN en células de crecimiento detenido.
- Modulan la transcripción de ciertos promotores.
- Se asocian o fusionan e inactivan los productos de genes celulares supresores de tumores p53 y pRb(41).

Cáncer bucal, genes supresores de tumores y HPV

La cavidad bucal humana está continuamente expuesta a agentes que pueden dañar el ADN celular. Si no se repara el daño celular, por ejemplo mutaciones o reajustes de genes supresores celulares puede producirse transformación maligna.

Existen dos tipos de genes que se han implicado en la transformación maligna. El primer grupo son los protooncogenes que codifican proteínas asociadas al crecimiento que se activan en respuesta a varias señales mitogénicas. Cuando mutan se convierten en oncogenes y producen proteínas que conllevan un crecimiento celular anormal. La expresión alterada de un oncogen solo generalmente es insuficiente para inducir una transformación completa y en la mayoría de casos contribuyen al proceso tumorogénico la activación de varios oncogenes. El segundo grupo de genes implicados son los genes supresores de tumores que codifican proteínas que tienen la capacidad de suprimir la división celular(15,17,42).

Así pues, la oncogénesis involucra la acumulación de múltiples alteraciones de oncogenes y genes supresores de tumores(43). La interacción de los productos de los genes E6/E7 de los HPV de "alto riesgo" con las proteínas celulares Rb y p53 puede representar un factor de progresión endógeno. Esto puede ser importante en la progresión de estadios de la carcinogénesis de premalignos a malignos(36). Por inhibición o aceleración de la degradación de proteínas que reprimen el crecimiento celular los HPV pueden expandir la reserva o "pool" de

células infectadas, incrementando potencialmente la producción viral. La misma liberalización del control celular es una característica importante de las neoplasias(22).

CORRESPONDENCIA

Dr. Cosme Gay Escoda
C/ Ganduxer, 140 4º
08022 BARCELONA

BIBLIOGRAFÍA

1. González Moles MA, Ruiz Avila I, Urquía M, Nogales F, Ceballos A. Papilomavirus humano y carcinoma escamoso. Revisión bibliográfica. Avances de Odontología 1992; 20: 361-73.
2. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus(HPV) infections and their associations with oral disease. J Oral Pathol Med 1991; 20: 305-17.
3. Zur Hausen H. Infecciones genitales por virus del papiloma. En: Oro J, Cuchillo M, Querol E, Segura R, Suau P. Virus, oncogenes y cáncer. Barcelona. Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona. 1984: 23-30.
4. Syrjänen S, Syrjänen K, Happonen R. Human papillomavirus(HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous carcinoma demonstrated by in situ hybridization. J Oral Pathol Med 1988; 17: 273-8.
5. Kiviat NB, Koutsky LA, Critchlow CW, Galloway DE, Venon DA, Peterson ML, et al. Comparison of Southern transfer hybridization and Dot filter hybridization for detection of cervical human papillomavirus infection with types 6,11,16,18,31,33 and 35. Am J Clin Pathol 1990; 94: 561-5.
6. Cox M, Eveson J, Scully C. Human papillomavirus type 16 DNA in an odontogenic keratocyst. J Oral Pathol Med 1991; 20: 143-5.
7. Khan MA. Ameloblastoma in young persons: a clinicopathologic analysis and etiologic investigation.

- Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 67: 706-15.
8. Van Heerden WFP, Van Rensburg EJ, Raubenheimer EJ, Venter EH. Detection of human papillomavirus DNA in an ameloblastoma using the in situ hybridization technique. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 109-12.
 9. Cox M, Eveson J, Porter S, Maitland N, Scully C. Human papillomavirus type 16 DNA in oral white sponge nevus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 476-8.
 10. Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
 11. Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 1993; 197: 176-87.
 12. De Villiers E. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63: 4898-903.
 13. Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 166-74.
 14. Howly PM. Papillomavirinae and their replication. En: Fields BN, Knipe DM. *Fundamental Virology*. New York. Raven Press. 1991: 743-63.
 15. Scully C, Cox M, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: the current status in relation to oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65: 526-32.
 16. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Cancer* 1983; 12: 418-24.
 17. Fenoglio-Preiser CM, Willman CL. *Molecular diagnostics in pathology*. Baltimore. Williams & Wilkins. 1991: 328-35.
 18. Seoane Lestón JM, Sánchez López M, Aguado Santos A, García Varela L, Romero Méndez A y cols. Detección de antígenos de papilomavirus humanos (HPV) en las lesiones papilomatosas del paladar. *Avances de Odontoestomatología* 1989; 5: 279-82.
 19. Doyle LA. Viral Carcinogenesis. En: Moossa AR, Schimpff SC, Robson MC. *Comprehensive textbook of oncology*. Baltimore. Williams & Wilkins. 1991.
 20. Miller CS, Zeuss MS, White DK. In situ detection of HPV DNA in oral mucosal lesions. A comparison of two hybridization kits. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 403-8.
 21. Van de Woude S, Van de Woude GF. Principles of molecular cell biology of cancer: introduction to methods in molecular biology. En: *Fundamental Virology*. Fields BN, Knipe DM. New York. Raven Press. 1991: 3-20.
 22. Howell RE, Galant L. Human papillomavirus type 16 in an oral squamous carcinoma and its metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 620-6.
 23. Wiener JS, Liu ET, Walther PJ. Oncogenic human papillomavirus type in association with squamous cell cancer of the male urethra. *Cancer Res* 1992; 52: 5018-23.
 24. Yeudall WA. Human papillomaviruses and oral neoplasia. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1992; 1: 61-6.
 25. Lawton GM, Thomas SJ, Schonrock J, Monsour FN, Frazer IH. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 265-69.
 26. Yeudall WA, Campo MS. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol* 1991; 125: 683-5.
 27. Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 714-20.
 28. Shroyer K, Greer R. Detection of human papilloma-

- virus DNA by in situ hybridization and PCR in pre-malignant and malignant oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 708-13.
29. Henke R, Guerin-Rverchon I, Milde-Langosch K. In situ detection of human papillomavirus types 13 and 32 in focal epithelial hyperplasia of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 419-21.
30. Min B, Baek J, Shin K, Gujuluva C, Cherrick H, Park N. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1994; 21: 459-64.
31. Steele C, Sacks Pg, Adler-Storthz K, Shillitoe EJ. Effect on cancer cells of plasmids that express antisense RNA of human papillomaviruses type 18. *Cancer Res* 1992; 52: 4706-11.
32. Adler-Storthz K, Newland JR, Tessin BA, Yendall WA, Shillitoe EJ. Human papillomavirus type 2 DNA in oral verrucous carcinoma. *J Oral Pathol* 1986; 15: 472-5.
33. Burmer GC, Parker JD, Bates J, East K, Kulander BG. Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and Virapap/Viratyping kits. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 554-60.
34. Miller CS, Zeuss MS, White DK. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using PCR together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 480-6.
35. Palefsky JM, Silverman Jr S, Abdel-Sallam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leucoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 193-7.
36. Lakshmi S, Nair SA, Pillai MR. Oral cancer and human papillomaviruses: is there a link? *J Surg Oncol* 1993; 22: 113-6.
37. Howley M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 1991; 51(Supl.): 5019-22.
38. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO Journal* 1989; 12: 3905-10.
39. Gissman L. Papillomavirus and human oncogenesis. *Current Opinion in Genetic and Development* 1992; 2: 97-102.
40. Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 1989; 59: 21-32.
41. Watts SL, Brewer EE, Fry TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 701-7.
42. Barbosa M, Vass W, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* 1991; 65: 292-8.
43. Lee NK, Ye Y-W, Chen J, Li X, Waber PG, Nisen PD. p53, retinoblastoma, and papillomavirus in squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1125-31z.