

Lucrecia Medina Myriam*
Medina Marcelo Gabriel**
Merino Luis Antonio**

Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por Virus del Papiloma Humano

The evaluation of molecular diagnostic techniques for detection of infection with human papilloma virus in the mouth

Fecha de aceptación: abril 2011

Resumen

La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) está considerada actualmente como la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente en el mundo. Muchas veces, estas infecciones son asintomáticas, pasando desapercibidas a no ser que se empleen métodos moleculares. Otras infecciones se vuelven crónicas, siendo las que tienen mayor potencial oncogénico. El virus se detectó en carcinoma bucal de células escamosas, así como en lesiones benignas de mucosa bucal, donde se encontró VPH de bajo y alto riesgo oncogénico. En mucosa bucal normal se identificaron diferentes tipos de VPH de alto riesgo oncogénico. Los estudios señalan que el hallazgo de VPH en mucosa sana depende del método de estudio empleado. No obstante, a pesar de la importancia del diagnóstico precoz, existe poca información respecto de la prevalencia de VPH en mucosa bucal sana. La infección por VPH puede diagnosticarse por diferentes métodos, pero no todos permiten detectar el genoma ni determinar el tipo viral involucrado. La tipificación del VPH permite conocer tipos virales circulantes en una población, facilitando el desarrollo e implementación de programas de prevención, diagnóstico y tratamiento adecuados, por lo que la identificación de VPH de alto riesgo oncogénico debería realizarse rutinariamente. Si bien, los mejores métodos diagnósticos son las pruebas moleculares, debe considerarse la prevalencia geográfica para los diferentes tipos de VPH en la elección del método específico para evitar conclusiones inexactas. Finalmente, nuevos métodos de detección de VPH bucal están siendo estudiados, considerando beneficios para prevención y tratamiento del cáncer bucal.

Palabras clave: *métodos, biología molecular, VPH, bucal.*

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is now considered the sexually transmitted infection (STI) most common in the world. Often, these infections are asymptomatic, passing unnoticed unless molecular methods are used. Other infections become chronic, with the greatest potential oncogenic. The virus was detected in oral squamous cell carcinoma and benign lesions of oral mucosa, where it was found high and low HPV oncogenic risk. In normal oral mucosa identified different types of high oncogenic risk HPV. Studies indicate that the finding of HPV in healthy mucosa depends on the method of study employed. However, despite the importance of early diagnosis, there is little information on the prevalence of HPV in oral mucosa healthy. HPV infection can be diagnosed by different methods, but not all the genome to detect or determine the viral type involved. HPV typing can find viral types circulating in a population, facilitating the development and implementation of programs for prevention, diagnosis and treatment, so the identification of high cancer risk HPV should be performed routinely. Although the best diagnostic methods are molecular testing should be considered the geographical prevalence of different types of HPV in the choice of specific method akin to avoid inaccurate conclusions. Finally, new methods of detection of oral HPV are being studied, considering benefits for prevention and treatment of oral cancer.

Key words: *methods, molecular biology, HPV, oral.*

*Facultad de Odontología

**Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste.

Correspondencia: Luis A. Merino

Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste.

Av. Las Heras 727. Resistencia. Chaco. Argentina. CP 3500.

Tel.: +55 37 83 43 79 90

Fax: +54 37 22 42 2793

Dirección electrónica: lamerino@gigared.com

Introducción

La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) es considerada actualmente como la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente en el mundo.¹ La gran mayoría de estas infecciones son asintomáticas o subclínicas, pasan desapercibidas a no ser que se empleen métodos moleculares para detectar fragmentos del genoma en las células infectadas. Casi todas las infecciones son transitorias, pues son controladas por la respuesta inmune, sólo entre el 10% y 20% de las mismas se vuelven crónicas o persistentes, siendo éstas las que tienen mayor potencial oncogénico.² La infección por VPH puede diagnosticarse por diferentes métodos, pero sólo las técnicas moleculares permiten detectar con alta sensibilidad el genoma del virus y determinar el tipo viral involucrado en diferentes clases de muestras como: células exfoliadas, tejidos embebidos en parafina o tumores frescos.³ La tipificación es importante en la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento más adecuado de pacientes.⁴ Los métodos moleculares de detección y/o identificación del ADN de VPH disponibles son: Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y Sistema de Captura de Híbridos (SCH). La PCR puede combinarse con la hibridación o digestión enzimática de los productos de amplificación para la tipificación viral.⁵ Sin embargo, debe tenerse en cuenta la prevalencia geográfica para los diferentes tipos de VPH en la elección del método más específico.⁶ No obstante, teniendo en cuenta que existe discrepancia entre los autores, respecto de la determinación del método molecular de elección para la detección de la infección por VPH en cavidad bucal, se planteó el presente trabajo con el objeto de valorar las técnicas moleculares diagnósticas disponibles para la detección de la infección por VPH en cavidad bucal mediante la presente revisión de la evidencia científica.

Importancia del empleo de métodos moleculares para la detección de VPH en Cavidad Bucal

Se ha detectado el virus en carcinoma bucal de células escamosas en una proporción del 50%, así como en lesiones benignas de mucosa bucal, donde se encontró VPH de bajo y alto riesgo oncogénico.⁷ En muestras provenientes de mucosa bucal normal se han podido identificar diferentes tipos de VPH de alto riesgo oncogénico.⁸ Los resultados señalan que en mucosa sana y en relación con el método de estudio es posible el hallazgo de VPH en el 13 al 40% de las muestras, con material obtenido por biopsias, citología exfoliativa (citobrush, hisopo o espátula) o por enjuague bucal.⁹ Asimismo, la persistencia de la infección por VPH en lesiones bucales, es importante más aun si se encuentran asociadas con hábitos que pueden afectar la mucosa bucal.¹⁰ La combinación de factores de riesgo podría potenciar cambios celulares de lesiones clínicamente benignas con transformación, premalignas y/o malignas de la cavidad bucal. No obstante, a pesar de la importancia del diagnóstico precoz, existe poca información respecto

de la prevalencia de VPH en la mucosa bucal clínicamente sana.¹¹ Asimismo, existen diferencias en los rangos de prevalencia de VPH de cavidad oral entre los estudios con PCR, dichas variaciones, aún confusas, se podrían deber a: método de recolección de muestras, baja carga viral de las muestras, diferentes sensibilidades de la PCR, en otros; lo que llevaría a conclusiones inexactas.¹² Distintos investigadores, han usado la PCR con el fin de detectar y tipificar al VPH señalándola como la técnica más rápida y sensible para la detección del ADN viral.¹³

Muestras biológicas:

Recolección y conservación

Las condiciones de la muestra en lo que hace a la cantidad, calidad y conservación tal como los procedimientos de preparación del ADN pueden afectar los resultados de los diferentes métodos moleculares de detección del VPH, pudiendo subestimar la detección viral.¹⁴ La obtención de ADN de alta calidad es crítica para métodos genéticos-moleculares.¹⁵ Generalmente los métodos que no usan el paso de amplificación tal como la Captura de Híbridos de Segunda Generación (HC2) están menos afectados por estas variables, mientras que los procedimientos basados en PCR toleran menos las impurezas por su naturaleza enzimática. Por lo tanto, es necesario el uso de dispositivos que permitan la recolección de grandes cantidades de células de la muestra, como el citobrush, y medios de conservación y transporte que conservan la morfología de la célula y estabilizan el ADN y el ARN.¹⁴

El tipo de muestra a utilizar en la tipificación de VPH es fundamental, debido a que la calidad del ADN extraído puede variar considerablemente, afectando la sensibilidad y especificidad del método usado.¹⁶ Se ha realizado ¹⁸, cepillado¹⁹, espátula de Ayre¹⁹ e incluso frotis teñido⁵. Sin duda, cada método tiene sus ventajas o desventajas. De esta manera para elegir el mejor material y método se requiere de la evaluación de ciertos parámetros como: dificultad en la toma de muestra, costo y reproducibilidad del método de detección.¹⁵

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos de la muestra, tiene un efecto inverso sobre la eficacia de la PCR. Para la amplificación de ADN provenientes de material de archivo, se aconseja usar iniciadores que amplifiquen secuencias de ADN viral no superior a 200 pb.²⁰ Una de las ventajas de la PCR es que se puede analizar mediante este método tejidos de más de 40 años de antigüedad. Además es posible emplearla especialmente en aquellas lesiones de carácter atípico y de significado incierto.¹⁵ No obstante, muchas veces el ADN extraído desde el tejido fijado, no es adecuado para la amplificación por PCR, por el fraccionamiento o degradación que sufre el ADN durante el proceso de fijación. La formalina búfer al 10% (pH neutro) está considerada como un factor adecuado para preservar el ADN en tejidos de archivo.²¹ El tejido congelado es considerado una mejor fuente de ácidos nucleicos que el tejido fijado, ya que no es sometido a procedimientos que puedan introducir inhibidores de la PCR o provocar degradación del ADN.¹⁸

Algunos estudios señalan el cepillado como el mejor método para obtención de material para la detección de VPH con 100% de correlación con el diagnóstico morfológico de VPH.¹⁵ Existen estudios que compararon la eficacia de la citología de muestras de cepillado con muestras obtenidas mediante espátula o torundas de algodón y claramente se ha demostrado que la calidad de frotis para diagnóstico con cepillado es superior.²² Esto porque el cepillado incorpora un barrido extenso que permite recoger suficiente cantidad de células para análisis. Además una muestra de cepillado presenta las siguientes ventajas: se procesa en fresco y no es necesario congelarla ni someterla a fijación. El método de extracción del ADN es más rápido y con menos manipulación, evitando la contaminación, que el aplicado al tejido congelado y al tejido fijado, donde la técnica es más laboriosa, aumentando el riesgo de contaminación.²³ Desde el punto de vista clínico: puede ser fácilmente obtenido y de menor costo.¹⁵

En cuanto a la conservación, algunos estudios señalan que se puede conservar la muestra hasta 30 días a temperatura ambiente. Otros establecen la adecuada conservación de la muestra a temperatura ambiente hasta una semana, a 4 °C hasta un mes y -20 °C indefinidamente.¹⁴

Valoración de Métodos Moleculares de Procesamiento

El método de recuperación del ADN es un importante determinante del éxito de la amplificación del ADN de VPH. Además considerando la relación que existe entre tipos específicos de VPH con el estado y la evolución de la infección, es importante conocer el tipo viral involucrado en una patología dada para arribar a un diagnóstico más preciso, tratamiento y seguimientos adecuados. Existen trabajos que reflejan una gran variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad de los distintos métodos empleados en la evaluación de la infección por VPH. Por otro parte debido a las ventajas, desventajas y/o limitaciones que presentan los distintos procedimientos moleculares para la detección de infección viral bucal, es importante el uso combinado de los mismos, de tal forma que permitan con alta sensibilidad y especificidad detectar la presencia de infección viral y determinar el genotipo de VPH.²⁴

Tipos de Pruebas Moleculares basadas en sondas con ácidos nucleicos

Las pruebas basadas en sondas pueden dividirse en 2 grandes grupos:

- 1. Pruebas con señales químicas de visualización amplificada;
- 2. Pruebas con la secuencia diana amplificada. En el cuadro 1 se señalan las pruebas moleculares más importantes.

Métodos de Hibridación Molecular

- **Southern Blot (SB)**
Este método de hibridación es considerado el “Estandar de oro”. Las muestras con alta carga viral pueden ser analizadas en forma confiable por esta técnica, mientras los que tienen baja carga viral pueden ser analizados únicamente por técnicas muy sensibles.

- **Sistema de Captura de Híbridos (SCH)**
Este sistema proporciona una sensibilidad cercana a la PCR y detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo (16,18,31,33,35,39,45,52,56,58,59,68) y 5 de bajo riesgo oncogénico (6,11, 42,43,44). Está estandarizado y es sumamente reproducible. No hay posibilidad de error durante el procesamiento porque el software invalida la corrida cuando los controles positivos y negativos reportan lecturas inesperadas. Según la literatura resulta un adecuado método para estudios epidemiológicos grandes por su reproductibilidad, buena sensibilidad y fácil muestreo.²⁵ Este método no discrimina los diferentes tipos de VPH hallados en una infección múltiple.²⁶ Esta metodología no resulta adecuada para el estudio de la infección por VPH en la cavidad bucofaríngea ya que existen asociaciones con genotipo de VPH como el 13 y 32 que no son detectados por el formato actual del sistema ya que no incluye las sondas específicas para estos tipos virales.
- **Hibridación *in situ* sobre muestras biológicas (HIS)**
Esta técnica únicamente detecta VPH en células, asimismo permite demostrar el ADN de VPH directamente en la pieza histológica.
- **Hibridización *in situ* sobre filtro (HISF)**
Este método es similar al Southern Blot pero de realización más sencilla. Además las muestras que tienen alta carga viral pueden ser analizadas en forma confiable por esta técnica.

Cuadro 1
Pruebas moleculares para la detección de secuencias de ADN y/o ARN.

Categoría molecular	Pruebas
Amplificación de la señal	Southern Blot (SB)
	Sistema de Captura de Híbridos (SCH)
	Hibridación <i>in situ</i> en muestras biológicas (HIS)
	Hibridación <i>in situ</i> sobre filtro (HISF)
	Dot Blot (DT)
Amplificación de secuencias	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

En el cuadro 2 se mencionan las ventajas, desventajas y/o limitaciones que presentan algunos de los procedimientos moleculares más usados.

Cuadro 2
Ventajas y Desventajas/Limitaciones de los procedimientos moleculares.

Ventajas		Desventajas/limitaciones
SB	Alta sensibilidad y especificidad	Procesamiento largo y difícil
	Detecta una molécula de ADN de HPV por célula	No permite detectar secuencias de ADN de tipos desconocidos
SCH	Alta sensibilidad y reproducibilidad	No resulta adecuada para infecciones por HPV bucofaringeas. No discrimina diferentes tipos de HPV en infecciones múltiples
	Buena sensibilidad	
HIS	Útil en tejidos	Sensibilidad no bien determinada
HISF	Fácil procesamiento	Baja sensibilidad y especificidad
DB		Sensibilidad moderada
PCR	Sensibilidad detecta 1 molécula de ADN de HPV	Requiere rigurosidad tecnológica

*Abreviaturas: SB (Southern Blot), SCH (Sistema de Captura de Híbrido), HIS (Hibridación *in situ*), HISF (Hibridación sobre filtro), Dot Blot (DB), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Presenta una sensibilidad aproximada del 90%, con un intervalo más compacto (84.9%-100%) y no varía con la edad. Mientras que la especificidad se incrementa con la edad y resulta más baja que en la citología.²⁷ Los resultados obtenidos con las PCR están sujetos al nivel de detección de la prueba molecular, pues la cantidad de ADN del virus en la muestra puede resultar insuficiente, tanto por una baja carga viral presente, como por el lugar de toma de muestra biológica, lo que no permitiría la detección del genoma viral mediante este método.²⁸ Algunos autores señalan que el límite de sensibilidad de la PCR es de 10 copias del ADN viral entre un millón de células.¹⁰ Otros, señalan que la distribución del ADN viral en las lesiones es focal, por lo que en células adyacentes que presentan los mismos cambios morfológicos, se pueden obtener resultados distintos en la detección de dicho ADN.²⁹

El ADN de VPH puede ser amplificado selectivamente mediante una serie de reacciones que incrementan la secuencia viral presente en las muestras biológicas.⁶ De acuerdo con la literatura, la sensibilidad y especificidad de los métodos PCR puede variar dependiendo solamente de las siguientes condiciones: métodos de muestreo; transporte; sets de primers; el tamaño de los productos de la PCR; condición de la reacción; funcionamiento de la ADN polimerasa empleada en la reacción; procedimientos de extracción de ADN; cantidad de ADN de VPH amplificado y habilidad para detectar múltiples tipos.^{6,26} Muchos procedimientos están disponibles para evitar estos potenciales problemas empleando protocolos para detección de ADN de VPH. Todos los métodos basados en la PCR tienen limitaciones para la

detección de infecciones múltiples debido al número de tipos de VPH detectables. Otro problema es la diferencia en la sensibilidad para distinguir tipos de VPH entre diferentes sistemas usados y la reproducibilidad de los diferentes métodos de VPH para la determinación del tipo exacto de VPH en la muestra.

Distintos tipos de PCR

• PCR en Tiempo Real

La determinación de la carga viral es algo muy importante ya que existen estudios de correlación entre el porcentaje de la carga viral y el incremento de riesgo para el desarrollo de lesiones. Actualmente no hay consenso sobre el mejor método para cuantificar VPH en muestras biológicas. Uno de los métodos más exactos disponibles es la PCR tiempo real, pero está sujeto a variaciones. Siendo una técnica muy interesante para estudios epidemiológicos por la información brindada.³⁰

• Nested PCR

Varios autores han demostrado que el uso de la Nested PCR empleando consenso de primers es un medio de extrema sensibilidad en la detección de los conocidos y nuevos tipos de VPH.^{31, 32} Mediante el empleo de primers PGMY09/11 fue posible una prevalencia de 19% de ADN de VPH en muestras bucales en oposición al 74% de prevalencia mediante los primers VPH de la Nested PCR. De acuerdo con la literatura, el ADN de VPH está presente en bajo número en muestras bucales y

existen células que no lo contienen, por lo que esta técnica proporcionaría una herramienta valiosa para la detección de VPH en muestras que contienen bajo número de ADN de VPH y nuevos tipos de VPH.³² Algunos autores señalan que una de las ventajas de esta técnica radica en que resulta ser extremadamente sensible y útil para detectar un amplio rango de tipos de VPH de mucosa. Además proporciona condiciones óptimas para la amplificación que hace posible alcanzarlas con relativa facilidad, pudiéndose identificar 10 tipos de VPH de alto riesgo y el VPH 11 que es el más frecuentemente hallado en cavidad oral.

Nuevas tecnologías para detección de VPH

- **Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).** La técnica molecular PCR-RFLP permite la identificación y tipificación del VPH con gran precisión y exactitud (una sola partícula viral puede ser detectada en 100 mil copias analizadas).¹⁶ Debido a esto, se ha sugerido como un método molecular de gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de la presencia y persistencia del VPH de alto riesgo.²⁰ El uso de la RFLP demostró ser útil en la identificación de múltiples infecciones de VPH tal como en la detección de nuevos tipos de VPH.³⁰ Asimismo, esta técnica puede identificar al VPH 11 que es comúnmente hallado en mucosa oral.³¹ Además puede ser usada para la detección de los tipos de VPH más comunes de alto riesgo y aquellos no identificados por este método podrían ser identificados por secuenciación directa de los productos de PCR empleando los primers de la PCR interna.³¹

Según la opinión de los autores, la RFLP fue capaz de identificar 2 tipos de VPH de bajo riesgo y 5 tipos de VPH de alto riesgo en algunos estudios, mientras que en otros la RFLP fue capaz de identificar 10 tipos de VPH de alto riesgo. La PCR-RFLP presenta mayor validez que los métodos morfológicos, mostrando una sensibilidad de 100%, una especificidad de 99% y un valor predictivo negativo de 100% respecto al diagnóstico histopatológico. Por su parte, según la literatura la identificación de los tipos de VPH usando RFLP con primers MY09/11 fue capaz de detectar una amplia gama de tipos de VPH conocidos así como pudo ser útil para la identificación de nuevos tipos de VPH.³¹

- **Sistema de Primers PGMY 09/11**
El sistema de Primers PGMY09/11 presenta una sensibilidad demostrada para la amplificación por PCR de 10 genomas de VPH. Según la literatura con este sistema se halló un incremento notable en la detección de múltiples infecciones y se logró amplificar ciertos tipos de VPH que fueron ineficientemente detectados usando otros métodos.³² Este sistema detecta el 90% de muestras con tipos múltiples de VPH.²⁶

- **Sistema GP5+/GP6+**

A través de este sistema se lograron tipificar 37 tipos de VPH mucosotrópicos permitiendo un alto rendimiento de procesamiento para estudios clínicos y epidemiológicos. Este sistema detecta solamente 47% de muestras con tipos múltiples de VPH.²⁶

Conclusión

Las implicaciones clínicas de la infección con VPH de alto riesgo oncogénico ha determinado que los investigadores sugieran la detección directa del VPH mediante métodos moleculares, teniendo en cuenta que tal detección puede ser importante en la estratificación del riesgo de progresión hacia lesiones mas graves. Además, muchas veces la infección por VPH puede estar latente por lo que sólo se diagnosticaría molecularmente. No obstante, según la literatura existe una gran variabilidad en cuanto a la sensibilidad y especificidad de los distintos métodos moleculares utilizados en el cribado del VPH, dependiendo del uso del método en sí, las características de la población/muestra evaluada, el tipo de lesiones y la cantidad y calidad del material biológico. Sin embargo, la tipificación del VPH es fundamental porque permite conocer los tipos virales circulantes en una población, facilitando el desarrollo e implementación de programas de prevención y tratamiento de esta enfermedad, por lo que, la identificación de VPH de alto riesgo oncogénico debería realizarse rutinariamente.

Finalmente, debe señalarse que existen nuevos métodos que están siendo estudiados para su inclusión clínica como procedimientos alternativos en la detección de VPH, a pesar de los altos costos y los inconvenientes técnicos, considerando las ventajas y beneficios que aportarían en el tratamiento de pacientes e incluso, en la prevención del cáncer bucal mediante la aplicación de programas que faciliten la detección y tratamiento de lesiones precancerosas.

Referencias

1. Rivera R, Delgado J, Prainel V, Barrero R, Larraín A. "Mecanismos de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical". *Rev Chil Obstet Ginecol* 2006; 71: 135-140.
2. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. "Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer". *Vaccine* 2006; 24 (3): 42-51.
3. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. "Classification of papillomaviruses". *Virology* 2004; 324: 17-27.
4. Khan M, Castle P, Lorincz A, Wacholder S, Sherman M, Scott D, *et al.* "The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type -specific HPV testing in clinical practice". *J Nat Cancer Inst* 2005; 97: 1072-1079.
5. Jacobs MV, Zielinski D, Meijer CJ, Pol RP, VoorHorst FJ, De Schipper FA *et al.* « A simplified and reliable HPV testing of archival Papanicolaou cervical smears:

- application to cervical smears from cancer starting with cytologically normal smears". *Br J Cancer* 2000; 82: 1421-6.
6. Iftner T, Villa LL. "Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies". *Journal of the Cancer Institute Monographs* 2003; 31: 80-88.
7. Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. "Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population". *Oral Diseases* 2004; 10: 163-166.
8. Jiménez C, Correnti M, Salma N, Cavazza M, Perrone M. "Detección del Virus Papiloma Humano en entidades clínicas benignas de la cavidad bucal mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación molecular". *Acta Odontol Venez* 2001; 39 (2): 1-6.
9. Gutiérrez RA, Colacino MC, Picconi MA, Alonio V, Teysie A, Keszler A. "Detección y tipificación de HPV en lesiones orales". *Dermatología Argentina* 2006; XII (2): 114-118.
10. Gradilone A, Vercillo R, Napolitano M, Cardinal G, Gazzaniga P, Silvestre J, Gandinni O, Tomao S, Agliano AM. "Prevalence of human papillomavirus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in the cervix healthy women". *J Med Virology* 1996; 50: 1-4.
11. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chan F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. "Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections". *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 459-64.
12. Shroyer KR, Greer RO. "Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71(6): 708-713.
13. Meijer C, Snijders P, Castle P. "Clinical utility of HPV genotyping". *Gyn Oncol* 2006; 103: 12-17.
14. Z. De Guglielmo, A. Rodríguez. "Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano". *An. Sist. Sanit. Navar.* 2010; 33 (1): 71-77
15. Melo AA, Roa EI, Montenegro HS, Capurro VI, Roa SJC. "Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino". *Rev Med Chile* 2005; 133: 639-644.
16. García F, Barker B, Santos C, Brown EM, Nuno T, Giuliano A, et al. "Cross-sectional study of patient and physician collected cytology and human papillomavirus". *Obstet Gynecol* 2003; 102: 266-72.
17. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG et al. "Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological of cervical adenocarcinoma". *Am J Pathol* 2000; 157: 1055-62.
18. Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. "Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections". *Prostate* 2002; 53: 263-76.
19. Lorenzato FR, Singer A, Ho L, Santos LC, Batista R de L, Lubambo TM et al. "Human papillomavirus detection for cervical cancer prevention polymerase chain reaction in self-collected samples". *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 962-8.
20. Shibata D, Martin WJ, Arnheim N. "Analysis of DNA sequences in forty years old paraffin-embedded sections: a bridge between molecular biology and classical". *Cancer Res* 1988; 48: 4564-6.
21. Peng HQ, Roth P, Caussey D, Rawls W. "Comparison of the cytobrush and cotton swabs in sampling for filter in situ hybridization detection of human 16 and 18 DNA". *Acta Cytol* 1988; 32: 311-3.
22. Redondo Horcajo AM, Guerra Merino A, Pinedo Garrido, García Aranda R. "Prevention of cervix cancer. Comparison of the simple quality obtained using cotton swab or cervical brush". *Aten Primaria* 2000; 38-41.
23. Wright DK MM. "Sample preparation from paraffin-embedded tissue". In: Innis M GD, Sninsky J, White T, editor. PCR protocols. *A guide to methods and applications*. San Diego, CA: Editorial Academic Press, Inc; 1990:p 153-8.
24. De Guglielmo CZ, Ávila HM, Correnti M, Veitia MD, Cavazza M. "Evaluación mediante RCP de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico". *Rev Obstet Ginecol Venez* 2008; 68(4): 240-247.
25. González Losa MR, Manzano-Cabrera L., Rueda Gordillo F, Hernández Solís SE, Puerto Solís M. "Low prevalence of high risk human papillomavirus in normal oral mucosa by hybrid capture 2". *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39: 32-34.
26. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. "PCR detection of human papillomavirus comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primers systems". *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1304-10.
27. Cox T, Cuzick J. "HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies". *Gynecol Oncol* 2006; 103: 8-11.
28. Castle P, Schiffmann M, Gravitt P, Fishman S, et al. "Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods". *J Med Virol* 2002; 68: 417-423.
29. Aedo S, Melo A, García P, Guzmán P, Capurro I, Roa JC. "Detección y tipificación de Virus Papiloma Humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP". *Rev Med Chile* 2007; 135: 167-173.
30. Graterol I, Finol H, Correnti M. "Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura". *Rev Soc Ven Microbiol* 2006; 26: 89-94.
31. Kay P, Meehan K, Williamson AL. "The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA". *Journal of virological methods* 2002; 105: 159-170.
32. Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Lapointe N, Richardson H, Coutlée F, et al. "Non-isotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format". *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3530-6.