

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume **50**

Número
Number **1**

Enero-Marzo
January-March **2003**

Artículo:

**Virus del papiloma humano.
Actualización y presentación de un caso
de carcinoma esofágico asociado a VPH**

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Virus del papiloma humano.

Actualización y presentación de un caso de carcinoma esofágico asociado a VPH

Palabras clave: Virus del papiloma humano, carcinoma esofágico.

Key words: Papillomavirus, human carcinoma, squamous cell, esophageal neoplasms.

Recibido: 19/12/2002

Aceptado: 24/01/2003

Sara Mandado Pérez,* William Haedo Quiñones,** Bienvenido Gra Oramas,*** Carlos Domínguez Álvarez,† Sacha Lazo Del Vallín,++ Ángela Elvírez Gutiérrez+++

* Lic. en Biología. Investigadora Agregada. IGE.

** Esp. de 2do grado de Gastroenterología, Investigador Auxiliar, Profesor Titular, Subdirector de Atención Médica, IGE.

*** Especialista de 2do Grado de Patología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Subdirector de Investigaciones, IGE.

† Esp. de 2do Grado de Patología. Invest. Auxiliar. Prof. Auxiliar, HCQ Hnos. Ameijeiras.

++ Esp. de 1er grado de Imagenología. Aspirante a Investigadora IGE.

+++ Esp. de 1er grado de Imagenología. Aspirante a Investigadora J' Dpto. Rx, IGE.

Correspondencia:

Sara Mandado Pérez

Instituto Nacional de Gastroenterología

Calle 25 No. 503, entre H e I, Vedado

C.P. 10400, Ciudad Habana, Cuba.

E-mail: smandado@infomed.sld.cu

12

Resumen

Se hizo una amplia revisión bibliográfica en relación a los virus del papiloma humano (VPH) a propósito de la presencia de imágenes coilocíticas en extendidos citológicos de cánceres de esófago. En nuestro caso se realizó citología por cepillado y biopsia a un paciente con epigastralgia y disfagia marcada a los sólidos; endoscópicamente se diagnosticó esofagitis grado IV con ulceraciones y pseudopolipos en la unión esofagogastrica. El extendido citológico mostró abundantes células típicas del VPH (coilocitos) con núcleos malignos. La enfermedad evolucionó violentamente y en las últimas endoscopias la tumoración ocluía la luz esofágica, pero las biopsias no eran concluyentes de malignidad. El paciente fue operado y el estudio histopatológico de la pieza quirúrgica demostró carcinoma epidermoide bien diferenciado de esófago, de aspecto verrucoso de baja malignidad por VPH.

Summary

A comprehensive literature review in relation to the human papilloma virus (HPV) was carried out with regard to the presence of coilocytic images in cytological culture broth of esophagus cancers. In the case of our study, cytology by brushing and a biopsy were performed to a patient suffering from a strong epigastralgia and dysphagia to solids; through endoscopy it was diagnosed esophagitis grade IV with ulcerations and pseudopolyps in the esophagic-gastric joint. The cytological culture broth showed plenty of cells characteristic of HPV (coilocytes) with malign nucleuses. The disease evolved in a violent way and in the last endoscopies the tumor occluded the esophagus opening; however, the biopsies were not conclusive of malignancy. The patient passed through surgery and the histopathological study from the surgical piece demonstrated a well-differentiated epidermoid esophagus carcinoma which presented a wart-like aspect with a low malignancy due to HPV.

Presentación del caso

Paciente masculino de 27 años de edad, con antecedentes de dispepsia, hernia hiatal y esofagitis por reflujo gastroesofágico. Hacía cinco meses presentaba discretos signos de disfagia, pirosis y acidez, los cuales se agudizaron, con vómitos frecuentes, reflujo de flemas y saliva espumosa, marcada disfagia a los sólidos, epigastralgia y dolor que irradiaba a la espalda. Se le realizó endoscopia, citología por cepillado y biopsia. La endoscopia visualizó una formación mamelonada, friable y edematosas, dando la imagen de pseudopólipos erosionados; se concluyó esofagitis grado IV con ulceraciones y pseudopólipos de la unión esofagogástrica.

La citología mostró células escamosas con caracteres de malignidad, perlas de células queratinizadas, coilocitos con núcleos malignos (*figura 1*) e imágenes repetitivas de células intermedias discarióticas con vacuolas que rechazaban al núcleo y éste aparecía semiplegado, algunas presentaban inclusiones en su interior (*figuras 2 y 3*). También fueron observadas células necróticas, mucus, monilias y leucocitos. Los grupos de células glandulares no presentaban alteraciones.

En la biopsia se informó esofagitis crónica con áreas de agudización e hiperplasia atípica de la capa basal.

Se realizaron varias endoscopias con biopsias. La evolución de la enfermedad fue violenta, los pseudopólipos ocluyeron la luz esofágica impidiendo el paso del equipo (*figuras 4 y 5*). Tanto las endoscopias como el esofagograma diagnosticaban neoplasia del tercio inferior del esófago; sin embargo, las biopsias no eran concluyentes de malignidad. El paciente fue operado.

Pieza quirúrgica: segmento esofágico de 18 cm con una porción gástrica de 4 x 6 cm. A 6 cm de la sección superior se encontró una masa mamelonada con áreas de aspecto papilar, de color blanco-rosado que se extendía 12 cm, ocupando toda la luz esofágica. Al corte se observó consistencia elástica y blanquecina con grosor variable entre 0.8 y 1.8

cm, con áreas puntiformes de aspecto necrótico. Se disecaron seis ganglios de entre 0.3 y un centímetro. El segmento gástrico no mostraba alteraciones.

El diagnóstico histológico fue carcinoma epidermoide bien diferenciado de esófago, de aspecto verrucoso de baja malignidad por VPH (*figuras 6, 7 y 8*), sin metástasis en los ganglios examinados.

El paciente operado siguió un tratamiento con citostáticos en el INOR.

Actualización en los VPH y discusión del caso

Los VPH son un grupo heterogéneo de virus que constituyen la subfamilia *Papovavirinae* y junto con la subfamilia *Polyomavirinae* forman la familia *Papovaviridae*.¹⁻⁶

Los VPH son partículas icosahédricas sin envoltura, con un diámetro aproximado de 55 nm, que contienen un genoma de ADN de doble cadena, circular, covalentemente cerrado, de 7,500 a 8,000 pares de bases y se completa con histonas celulares.^{1,7}

Vulgarmente éstos son conocidos como los virus de las verrugas y la mayor parte de la población, incluso algunos profesionales, sólo los asocian a los condilomas genitales.

En la década de los 60 se pensaba que sólo existía un tipo viral y que la naturaleza del epitelio infectado era probablemente la responsable de las características morfológicas y el comportamiento de las verrugas.¹

El vertiginoso desarrollo de las modernas técnicas de biología molecular, fundamentalmente las técnicas de reacción en cadena de polimerasas (PCR) ha permitido avanzar a pasos agigantados¹⁻⁴ y ya en 1996 se habían caracterizado 77 tipos, clasificados de acuerdo a su localización en el cuerpo humano, secuencia genómica y carácter oncogénico.^{1,5} En 1999 habían sido bien estudiados y completamente secuenciados 85 genotipos y aproximadamente 120 nuevos genotipos parcialmente secuenciados.^{1,6,7} Actualmente se conocen 216 tipos.¹

La organización genómica del virus es similar en todos los tipos de VPH. Está constituido por tres regiones fundamentales: E (región temprana), LCR (gran región de control) y L (región tardía). La primera codifica todas las proteínas E que están involucradas en la persistencia del genoma viral, en la replicación del ADN y en la activación del ciclo lítico; además, participa en la transformación celular y regula los genes virales, por lo que se considera la región más importante en la patogénesis del cáncer invasivo. La región L codifica las proteínas estructurales de la cápside L₁ y L₂. La región LCR se encuentra entre las regiones E y L, es la gran región de control, que no contiene secuencias codificadoras, pero posee promotores y amplificadores importantes en la regulación de la transcripción de los genes virales. Ésta constituye 10% del genoma del virus.^{1,7}

Las proteínas E₆ y E₇ son las más importantes para el desarrollo del cáncer; su expresión genética está directamente comprometida con el fenotipo maligno en los tejidos cancerosos, por esta razón, son consideradas oncoproteínas. La proteína E₆ tiene la capacidad de unirse a la proteína P53, un importante regulador negativo del crecimiento celular y supresor de tumores. La proteína E₆ se localiza en la matriz nuclear y en las membranas no nucleares.¹

La proteína E₇ puede inactivar la proteína celular Rb, regulador negativo del crecimiento celular, y se localiza en el citoplasma de las células infectadas. Su expresión en queratinocitos humanos es suficiente para inducir transformación celular y su efecto es mucho mayor cuando se expresa junto con la E₆. Además se ha demostrado que la oncoproteína E₇ del VPH 16 actúa como modulador del efecto del IFN α 2b en una línea tumoral humana.⁷

Las proteínas E₆ y E₇ en los VPH de bajo riesgo presentan menor afinidad con las proteínas P53 y Rb respectivamente.^{1,7}

Los VPH infectan solamente las células epiteliales, sin conocerse completamente el mecanismo de esta restricción.

Es importante conocer el papel que juegan estos virus en la patogénesis del cáncer en las dife-

rentes localizaciones del cuerpo humano; son capaces de infectar las células de la capa basal del epitelio, se replican y expresan en estrecha coordinación con el programa de diferenciación del mismo. El desarrollo del cáncer de origen epitelial a causa de la infección mantenida por VPH constituye un proceso que después de una larga latencia, pasa a un estadio premaligno, conocido como neoplasia intraepitelial, en el cual se experimentan cambios fenotípicos de las células infectadas y finalmente la lesión evoluciona a carcinoma *in situ*.¹⁻¹⁹

De acuerdo a su carácter oncogénico se les clasifica en grupos de alto y bajo riesgo; algunos autores los clasifican en tres niveles de riesgo, incluyendo en el grupo de alto riesgo los VPH 16 y 18, en el de mediano riesgo los tipos 31, 33, 35, 51, 52 y 58 y en el de bajo riesgo los tipos 6, 11, 42, 43 y 44. Estos autores mantienen la hipótesis de que los tipos de alto riesgo están presentes en menos de 30% de los NIC I (displasias ligeras), mientras los mismos están asociados en 90% de los casos con NIC II (displasias moderadas) y NIC III (displasias severas).⁹

Trabajos más recientes utilizando técnicas de PCR en un estudio internacional, multicéntrico de un numeroso grupo de muestras de países de varios continentes han demostrado la presencia de estos virus en 99.7% de los cánceres invasivos de cuello uterino estudiados; en estos trabajos se demostró que se habían reportado falsos negativos por dificultades técnicas, por lo que se plantea que los VPH son el agente etiológico en 100% de los cánceres cervicouterinos.^{1,17-19}

Entre las lesiones más comunes por VPH en humanos figuran: papilomatosis laringea, condiloma acuminado y plano cervicouterino, verrugas cutáneas vulgares y plantares, lesiones en la conjuntiva ocular, displasias y carcinomas anogenitales, y adenocarcinomas de próstata.¹⁻¹⁶

Los tipos 1 y 2 causan las verrugas de las manos y los pies. Los tipos 6, 11, 16, 18 y 31 están asociados a las neoplasias anogenitales, estos tipos son usualmente adquiridos a través del contacto sexual. Los tipos oncogénicos generalmente no están asocia-

dos a verrugas genitales visibles (condilomas), pero las pruebas de tipificación de ADN de los VPH de verrugas genitales en la población con VIH han revelado la presencia simultánea de ambos tipos, de bajo y de alto riesgo.^{4,8} Los tipos 16, 18 y 31 están más frecuentemente asociados con cáncer cervicouterino y anal. Los tipos 6 y 11 se relacionan más con verrugas genitales benignas (condilomas acuminados y planos).⁴

En las vías digestivas, la presencia de VPH ha sido demostrada en boca, faringe, esófago, colon, región rectosigmoides y ano.^{1-3,5-8,20-70}

El papiloma de esófago es raro, hasta 1975 habían sido reportados 58 casos; en un estudio más reciente de 7,100 endoscopias de la parte alta del esófago y 750 autopsias se encontraron cinco papilomas.²⁷ Actualmente los VPH son considerados factores predisponentes para el papiloma de esófago. Aunque los papilomas de esófago son poco frecuentes constituyen un posible eslabón para el desarrollo del cáncer esofágico cuando la infección por VPH es de los tipos 16 y 18.²²⁻⁵²

Existen reportes del potencial oncogénico de los VPH-16 en la carcinogénesis gástrica en animales de experimentación.^{66,67} Además, hay publicaciones recientes de trabajos en los cuales se ha demostrado la presencia de VPH en tejido hepático de infantes con hepatitis neonatal de células gigantes o con atresia de vías biliares extrahepáticas. Usando técnicas de PCR en estos casos el tipo detectado fue el mismo que había sido diagnosticado previamente en las verrugas genitales de sus respectivas madres (en uno de estos casos se había practicado cesárea), evidenciándose la vía de transmisión vertical de la infección.^{68,69}

Existen reportes de la presencia de ADN de VPH en lesiones metastásicas de carcinomas de cuello uterino.⁷⁰

Existen varios métodos de diagnóstico para detectar la infección por VPH:

1) Examen físico u observación de la lesión a simple vista.

- 2) Endoscopia: la más usada con el objetivo de diagnosticar lesiones por VPH es la colposcopia en ginecología.
- 3) Estudio citopatológico: el diagnóstico citológico en las lesiones por VPH con el empleo de microscopio óptico está dado por la presencia de coilocitos (células escamosas, generalmente de las capas intermedias, con una vacuola perinuclear bien definida y su núcleo hipercromático y retraido), y otras atipias celulares.
- 4) Estudio histopatológico.
- 5) Microscopía electrónica de transmisión: esta técnica nos permite visualizar las partículas virales en las lesiones por VPH en 10 a 50% de los casos, pero la morfología es idéntica en todos los tipos de VPH por lo que no es útil para tipificarlos, por lo que además deben aplicarse técnicas de inmunoelectromicroscopía.
- 6) Estudios serológicos: determinación de la presencia de anticuerpos específicos para VPH.
- 7) Técnicas de biología molecular, las más precisas y modernas utilizadas actualmente.

15

Entre las técnicas de biología molecular más utilizadas para determinar la presencia de VPH se encuentran: la reacción en cadena de polimerasa (PCR), las técnicas de hibridación molecular "Dot-Blot" (hibridación en mancha), "Southern blotting" y la hibridación *in situ*, éstas se pueden aplicar a células y tejidos frescos o congelados a -20°C y en tejidos desparafinados.^{1,11,16,20,23,24,37,54,64-66}

El método de hibridación en captura ha sustituido al Southern Blot en la detección de VPH en los últimos 4 años; su elevada sensibilidad combina el fundamento de los protocolos de hibridación con la metodología de los ensayos inmunoenzimáticos.¹

8) También han sido utilizadas técnicas inmunohistoquímicas (con el empleo de kits "DAKO")⁵⁵ para determinar la presencia de VPH en epitelio esofágico e intestinal normal, en papilomas y carcinomas esofágicos, y en adenomas y adenocarcinomas de colon.^{24,54,55}

Se han realizado estudios serológicos para determinar la respuesta inmunológica en pacientes infectados con VPH1, tipos 1, 6, 11, 16 y 18,⁷¹⁻⁷⁴ en los cuales se ha demostrado por métodos de ELISA respuesta de anticuerpos IgG.

Actualmente los científicos trabajan en función de una vacuna contra los VPH de alto riesgo, VPH16 y VPH18.^{1,7,71-75}

En un estudio realizado en China,³³ en un grupo de pacientes con cáncer esofágico se utilizaron diferentes métodos de obtención de la muestra para detectar VPH por PCR; se demostró la presencia del virus en 20 de 117 casos (17.1%), obteniéndose mayor eficiencia en los extendidos citológicos (10/24) 41.6%, en contraste con las biopsias (3/70) 4.3% y las muestras quirúrgicas (7/23) 30.4%.

En la literatura revisada se reporta una incidencia promedio de más de 20% de infección por VPH en los carcinomas de esófago, en 31.9% de los adenomas de colon y en 43% de los adenocarcinomas colorrectales, detectándose mayor incidencia del tipo VPH-16 en los adenomas vellosos, coincidentemente en los que presentaban mayor grado de displasia. En mucosa de colon normal los VPH estuvieron presentes en 8% de los casos estudiados.

Los VPH reportados en las vías digestivas han sido los tipos: 6, 9, 11, 13, 16, 18, 20, 24, 25, 30, 33, 51 al 54, 57, DL 231, DL 416, DL 428 y DL 436 (en esófago). En un trabajo realizado con biopsias esofágicas procedentes de áreas de alto riesgo de cáncer esofágico de China y de Sudáfrica se demostró la presencia de VPH, en tipos mucosales (6, 18, 51, 52 y 57) y en tipos cutáneos (9, 20, 24, 25, DL 231, DL 428 y DL 436), habiéndose detectado además casos con doble infección: 6 y 51, 6 y 57, 20 y 9, 20 y DL 231.³³

En colon han sido detectados los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33.^{62,64,65}

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones realizadas en colon para detectar VPH aplicando las técnicas de PCR han utilizado sets de primeros consensos.^{54-58,60-65}

En nuestro país, los VPH son bien conocidos por su importancia en ginecología, dentro de las

enfermedades de transmisión sexual, y por su papel en las lesiones precancerosas y cancerosas del cuello uterino; éstas son detectadas por la presencia de coilocitos en los extendidos citológicos al microscopio óptico, mediante la observación visual y colposcópica, y confirmados en el estudio histológico. Actualmente se aplican las técnicas de PCR en un número limitado de casos en el Programa Nacional de Control de cáncer cervicouterino. También los VPH han sido tema de interés de las especialidades de otorrinolaringología y proctología.

Sin embargo, en la especialidad de gastroenterología no se ha prestado atención a estos virus y no se tiene experiencia en relación a las neoplasias por VPH en esófago. Sólo conocemos de un estudio realizado por una especialista cubana en el extranjero²⁴ y del reporte de un caso similar al nuestro, presentado por el CIMEQ en el V Congreso Nacional de Gastroenterología,²⁸ pero en aquel paciente las lesiones se extendían a la boca y había sido polipectomizado mediante endoscopia y tratado con interferón α -2b recombinante de forma sistémica e intralesional. El diagnóstico se realizó mediante endoscopia y biopsia, no se hizo citología. En nuestro caso la presencia de coilocitos con caracteres de malignidad en el extendido citológico ofreció el diagnóstico desde el primer momento.²⁹

En la bibliografía revisada no hemos encontrado reportes de lesiones por VPH diagnosticadas mediante citología esofágica. En este caso los extendidos citológicos presentaban además de los coilocitos clásicos algunos con caracteres de malignidad e imágenes repetitivas de otras formas coilocíticas no descritas (figuras 2 y 3).

- Consideramos que la citología es un método diagnóstico útil para la detección de lesiones por VPH en cualquier localización del cuerpo humano, que esté revestido por epitelio escamoso.
- Se les recomienda a los endoscopistas tomar citología por cepillado en lesiones pseudopolipoideas blanquecinas de esófago.

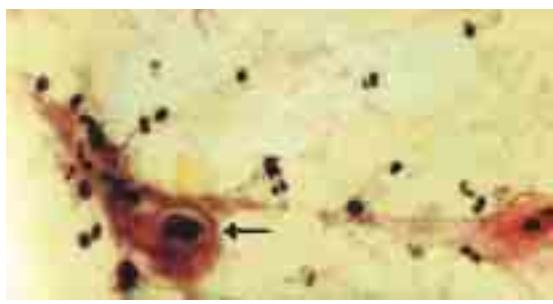


Figura 1. Coilocito maligno en forma de renacuajo, que muestra el halo perinuclear bien definido, (x 800) H y E.



Figura 2. Coilocito inmerso en una perla de células queratinizadas, (x 400) H y E.



Figura 4. Imagen endoscópica de la tumoración, en la cual se observa una formación polipoidea (caniniforme) de color blanquecino.

Figura 3. Una célula discariótica, con dos vacuolas bien delimitadas e inclusiones en su interior, una rechazando al núcleo, esta imagen fue repetitiva en todos los extendidos citológicos del paciente, (x 400) H y E.

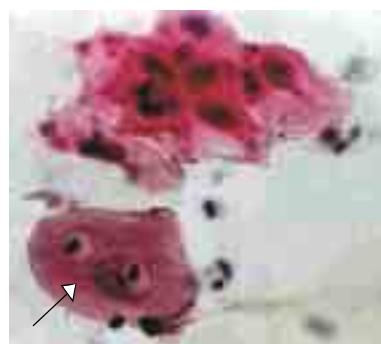


Figura 5. Vista endoscópica panorámica de la tumoración: múltiples formaciones polipoideas blanquecinas que llegaron a ocluir la luz esofágica.

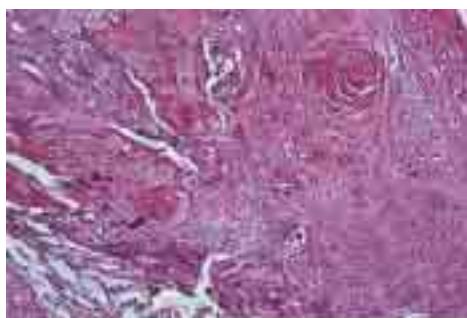


Figura 7. Fragmento de mucosa esofágica tumoral que muestra perlas de células queratinizadas y abundantes coilocitos, (x 200) H y E.

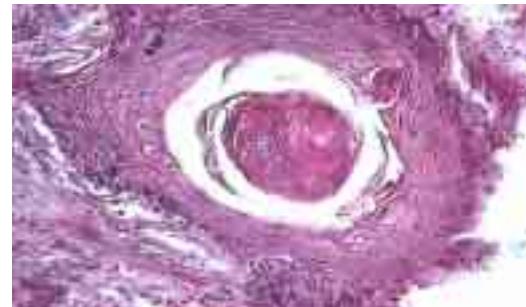
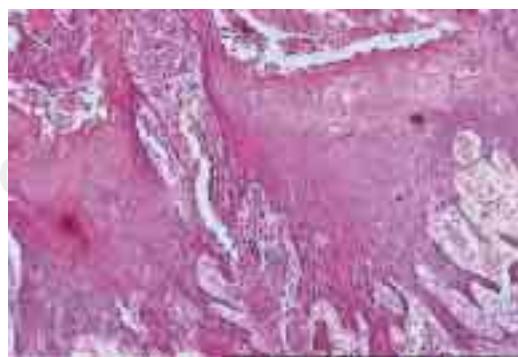


Figura 6. Corte transversal de una lesión papilomatosa con abundantes coilocitos en el carcinoma esofágico, (x 200) H y E.

Figura 8. Corte tumoral con arquitectura papilar y presencia de abundantes coilocitos, (x 200) H y E.



- Siempre que sea posible se deben tomar muestras para la tipificación del virus mediante técnicas de biología molecular.

Referencias

- Llop HA, Valdés-Dapena MM, Zuazo S. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Ciudad Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas, 2001: Tomo II: 79-108.
- Perea RSE, López OO, García MR, Araña MJ, López SP, Ríos MA. Impacto del interferón como regulador de la expresión génica del virus del papiloma humano en el cáncer cérvico-uterino. *Biología Aplicada*. 1997; 14: 197-200.
- Perea RE. El interferón como modulador de la expresión génica del virus del papiloma humano. *Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas*. La Habana: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1997.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB. Human Papillomavirus infection of cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. *Obst Gynecol* 1992; 79: 329-337.
- Zur HH. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1288: 55-78.
- Zur HH. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(6): 581-587.
- Moro SA. La Oncoproteína E₇ del VPH como modulador del efecto del IFN α 2b en una línea tumoral humana. *Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas*. La Habana. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2000.
- Hanna L. Human papillomavirus and anal neoplasia. *Bull Exp Treat AIDS* 1997; 37: 1-13.
- Hoyme UB. Sexually transmitted diseases in adult, non-pregnant women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993; 5(4): 521-526.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush B et al. Epidemiological evidence that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-963.
- Bycklov V, Isaacs JH. *Pathology in the practice of Gynecology*. Queens, New York, 1995: 25-26, 56, 91-92, 399.
- Sasco AJ. Screening for cancer: what's new? *Bull Cancer* 2000; 87: 239-437.
- Hillemanns P. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytologic normalities in HIV-seropositive women. *AIDS* 1996; 10: 1641-1647.
- Palefsky J, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiology* 1995; 4: 415-428.
- Edwards S, Carne C. Oral sex and the transmission of viral STIs. *Sex Transm Infect* 1998; 74: 6-10.
- Zarcone R, Addonizio D, Voto RI, Cardone G, Di Stefano M, Cardone A. HPV and HIV: HPV-DNA identification of colposcopic smears in HIV positive females through *in situ* hybridization technique. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1994; 21: 160-163.
- Walboomers JMM, Meijer CJLM. Do HPV negative carcinomas exist? *J Pathol* 1997; 181: 253-254.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosh FX, Kummer JA, Shah et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 1999; 189: 12-19.
- Harrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *Revisited Journal of Pathology* 1999; 189: 1-3.
- Soto Y, Valdés O, Muné M, Ramírez R, Pimentel T. Detección de papillomavirus humano (VPH) en tumores laringeos embebidos en parafina. *Medical Applications of Biotechnology* 1997; (4): D-42.
- Proby CM, Harwood CA. Role of human papillomaviruses in warts and cancer. *Hosp Med* 1998; 59: 33-36.
- Chang F, Syrjanen S. Infectious agents in the etiology of esophageal cancer. *Gastroenterology* 1992; 103: 1336-1348.
- Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Cintorino M, Santopietro R, Syrjanen K. Human papillomavirus involvement in esophageal carcinogenesis in the high incidence area of China - a study of 70 cases by screening and type specific *in situ* hybridization. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(2): 123-130.
- Carr NJ, Brathauer GL, Lichy JH, Taubenberger JK, Monihan JM, Sabin LH. Squamous cells papillomas of the esophagus: A study of 23 lesions for human papillomavirus by *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction. *Human Pathol* 1994; 25: 536-540.
- Winkler B, Capó V, Reumann W, Averill Ma, La Porta R, Reilly Sh, Green PMR, Richart RM, Crum CP. Human Papillomavirus infection of the esophagus. A clinicopathologic study with demonstration of Papillomavirus antigen by the immunoperoxidase technique. *Cancer* 1985; 55: 149-155.
- Togawa K, Rustgi AK. Human papillomavirus 16 and 18. Replication in esophagus squamous cancer cell lines does not require heterologous E₁ and E₂ proteins. *J Med Virol* 1995; 45: 435-8.
- Togawa K, Rustgi AK. A novel papillomavirus sequence based on L1 general primers. *Virus-Res* 1995; 36: 293-297.
- Velérdiz S, Vázquez JJ. Papilomas del esófago: Aportación de 5 casos y revisión de la literatura. *Rev Esp Ap Digest* 1989; 75: 259-261.
- Samada M, González CJ, Paniagua EM, Sabatier CA. Tratamiento endoscópico de papilomatosis esofágica por VPH. Presentación de un caso. *CIMEQ. Programa y resúmenes*. V Congreso Nacional de Gastroenterología 1998; Nov 16-18; La Habana, Cuba. La Habana: Palacio de las Convenciones de la Habana, 1998: 330.
- Mandado PS, Gra OB, Haedo QW, Domínguez AC. Imágenes citológicas del virus del papiloma humano (VPH) en un carcinoma epidermoide de esófago. Presentación de un caso. *Rev Cub de Oncología* 2001; 17: 48-53.
- Dillner J, Knekt P, Schiller JT, Hakulinen T. Indicios seroepidemiológicos prospectivos de que la infección por papiloma virus humano tipo 16 es un factor de riesgo para carcinoma esofágico de células escamosas. *BMJ Edición Latinoamericana*. 1996; 4(No. especial): 26.
- Li T, Lu ZM, Chen KN, Guo M, Xing HP, Mei Q, Yang HH, Lechner JF, Ke Y. Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the incidence of esophageal cancer in Anyang area of China. *Carcinogenesis* 2001; 22: 929-934.
- Chang F, Syrjanen S, Shan Q, Cintorino M, Santopietro R, Tosi P, Syrjanen K. Evaluation of HPV, CMV, HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinomas from a high incidence area of China. *Anticancer Res* 2000; 20: 3935-3940.
- De Villiers EM, Lavergne D, Chang F, Syrjanen K, Tosi P, Cintorino M, Santopietro R, Syrjanen S. An interlaboratory study to determine the presence of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma from China. *Int J Cancer* 1999; 81: 225-228.
- Lavergne D, de Villiers EM. Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 80: 681-684.
- Takahshi A, Ogoshi S, Ono H, Ishikawa T, Toki T, Ohmorri N, Iwasa Y, Furihata M, Otsuki Y. High-risk human papillomavirus infection and overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus from Japan. *Dis Esophagus* 1998; 11: 162-167.

36. Sur M, Cooper K. The role of the human papillomavirus in esophageal cancer. *Pathology* 1998; 30: 348-354.
37. Al-sohaibani MO, Al-Rashed RS. Squamous papilloma of the esophagus- a clinicopathologic study of 10 cases and review of the literature. *Ann Saudi Med* 1995; 15: 140-142.
38. Ming SC. Tumors of the esophagus and stomach. *Atlas of tumor pathology. Series 2*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1982: 22.
39. Javdan P Pitman RP. Squamous papilloma of the esophagus. *Digestive Dis Sci* 1984; 29: 317-320.
40. Parnell SA, Peppercom MA, Antonioli DA et al. Squamous cell papilloma of the esophagus. Report of a case after peptic esophagitis and repeated bougienage, with review of the literature. *Gastroenterol* 1978; 74: 910-913.
41. Syrjanen KJ, Pyrhönen S, Ankec S, Koskela E. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumor probably caused by human papillomavirus (HPV). *Diag Histopathol* 1982; 5: 291-296.
42. Kulski J, Demeter T, Sterret GF, Shilkin KB. Human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma. *Lancet* 1986; 2: 683-684.
43. Odse R, Antonioli R, Shoket D et al. Esophageal squamous papillomas: a clinicopathological study of 38 lesions and analysis for human papillomavirus by the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 803-812.
44. Colina F, Solis JA, Muñoz M. Squamous papilloma of the esophagus. A report of three cases and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1980; 74: 410-414.
45. Frazin G, Musola R, Zamboni G, Nicolis A, Manfrini C, Fratton A. Squamous papillomas of the esophagus. *Gastrointestinal Endoscopy* 1983; 29: 104-106.
46. Sabblich R, Benedetti G, Bignucule S, Serraino D. Squamous cell papilloma of the esophagus. Report on 35 endoscopic cases. *Endoscopy* 1988; 20: 5-7.
47. Adler RH, Carberry DM, Ross CA. Papilloma of the esophagus, association with hiatus hernia. *J Thorac Surg* 1959; 37: 625-635.
48. Quintadam M, Benson J. Squamous papilloma of the esophagus: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 194-201.
49. Al-Rshed RS. Squamous cell papilloma of the esophagus: a case report and review of the literature. *Ann Saudi Med* 1992; 12: 313-315.
50. Tripodi ChF, Syrjanen S, Shen Q, Cintorino M, Alia L, Santopietro R, Tosi P, Syrjanen K. Quantitative image analysis of esophageal squamous cell carcinoma from the high incidence area of China, with special reference to tumour progression and papillomavirus (HPV) involvement. *Anticancer Res* 2000; 20: 3855-3862.
51. Shen Z, Cen S, Shen J, Cai W, Xu J, Teng Z, Hu Z, Zeng Y. Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV 18E₆E₇. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 10: 539-594.
52. Lambot MA, Haot J, Peny MC, Fait I, Noel JC. Evaluation of the role of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63(2): 154-155.
53. Vasudevan DM, Vijayakumar T. Viruses in human oral cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 1998; 17: 27-31.
54. Mc Gregor B, Byrne P, Kirgan D, Albright J, Manalo P, Hall M. Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer. *Am J Surg* 1993; 166: 738-742.
55. Kirgan D, Manalo P, Mc Gregor B. Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus antigen in human colon neoplasms. *J Surg Res* 1990; 48: 397-402.
56. Kirgan D, Manalo P, Hall M, Mc Gregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasms. *Arch Surg* 1990; 125: 862-865.
57. Manalo P, Highison G, Mc Gregor B, Hall M. Electron microscopic evidence of papillomavirus in human colon neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 413.
58. Nuovo G. Evidence against a role for human papillomavirus in colon neoplasms (letter). *Arch Surg* 1991; 126: 656.
59. Koulos J, Symmans F, Chumas J, Nuovo G. Human papillomavirus detection in adenocarcinoma of the anus. *Mod Pathol* 1991; 4: 58-61.
60. Cheng J, Meng C, Chao C, Gau S, Lin J. Human papillomavirus type related DNA and C-MYC oncogene alterations in colon cancer cells lines. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 469-474.
61. Palmer J, Scchollefield J, Coates P. Anal cancer and human papillomaviruses. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 1016-1022.
62. Cheng JY, Sheu LF, Lin JC, Meng CL. Detection of human papillomavirus DNA in colorectal adenomas. *Arch Surg* 1995; 130: 73-76.
63. Frish M, Glimelius B, Van Den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walbcomers JM, Adam HO, Melbye M. Benign anal lesions, inflammatory bowel disease and risk for high-risk human papillomavirus-positive and negative anal carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 78: 1534-1538.
64. Cheng JY, Sheu LF, Meng CL, Lee WH, Lin JC. Detection of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas by polymerase chain reaction. *Gut* 1995; 37: 87-90.
65. Shah KV, Daniel RW, Simons JW, Vogelstein B. Investigation of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction. *J Surg Oncol* 1992; 51: 5-7.
66. Soto Y. Aplicación de la técnica en Cadena de Polimerasa para la detección de secuencias de papillomavirus humano. *Rev Cub Med Trop* 1998; 3(50): 191-198.
67. Sundberg JP, Kenty GA, Beamer WG, Adkison DL. For stomach papillomas in flaky and steel- Dickie mutant mice. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 312-317.
68. Serle PF, Thomas DP, Faulkner KB, Tinsley JM. Stomach cancer in transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 early region genes from a keratin promoter. *J Gen Virol* 1995; 76: 2631.
69. Drut R, Gómez MA, Drut RM, Cueto RE, Lojo M. Human papillomavirus, neonatal giant cell hepatitis and biliary duct atresia. *Act Gastroenterol Latinoam* 1998; 28: 27-31.
70. Drut R, Gómez MA, Drut RM, Lojo MM. Human papillomavirus (HPV)- associated neonatal giant cell hepatitis (NGCH). *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 403-412.
71. Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa. Detection of human papillomavirus DNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the cervix in women from Okinawa, Japan. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 160-166.
72. Galloway DA. Papillomavirus capsids: a new approach to identify serological markers of HPV infection. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 474-475.
73. Kimbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowi DR, Schiller JT. A virus like particle ELISA detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 494-498.
74. Heino P, Eklund C, Fredriksson SV, Goldman S, Schiller JT, Dillner J. Association of serum IgG antibodies against human papillomavirus type 16 capsids with anal epidermoid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 437-440.
75. Chen CH, Ji H, Suh KW, Choti MA, Pardoll DM, Wu TC. Gene gun-mediated DNA vaccination induces antitumor immunity against human papillomavirus type 16 E₁-expressing murine tumor metastases in the liver and lungs. *Gen Ther* 1999; 6: 1972-1981.