

Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe

Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx

Therezita Peixoto Patury Galvão Castro¹, Ivo Bussoloti Filho²

Palavras-chave: papiloma virus humano, orofaringe
Key words: human papillomavirus (HPV), oral.

Resumo / Summary

A prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe ainda não está bem esclarecida como nos estudos do trato genital, na qual é bem definida. Entretanto, novas pesquisas estão surgindo após o aparecimento dos exames de biologia molecular. Neste estudo foi realizada uma revisão da literatura com o objetivo de verificar a prevalência do papilomavírus humano na cavidade oral e na orofaringe. Os resultados desta pesquisa mostraram uma prevalência do HPV 16 na mucosa oral normal (infecção latente). Já nas lesões benignas orais associadas ao HPV mostraram uma prevalência do HPV 6 e 11 em papilomas de células escamosas e condilomas, e, nas verrugas, uma prevalência do HPV 2 e 57, enquanto na hiperplasia epitelial focal prevaleceram os HPV 13 e 32, e no câncer oral, principalmente, no carcinoma de células escamosas (CCE), foi evidenciada uma alta prevalência do HPV 16, o que sugere sua participação na carcinogênese oral, apesar de ser um assunto controverso. Constatou-se também uma enorme discrepância nos resultados da prevalência do papilomavírus humano (HPV) na mucosa oral normal (infecção latente) e no câncer oral, enquanto nas lesões benignas associadas ao vírus, os resultados foram confirmatórios.

The prevalence of human papillomavirus (HPV) in the oral cavity and oropharynx has not yet been as well studied as its infection of the vaginal tract. However, new study are emerge after the development of molecular biology techniques. The objective of this study is to show the prevalence of HPV in the oral cavity and the oropharynx. An ample bibliographic review was done showing a prevalence of HPV 6, 11 in a normal oral mucous membrane (latent infection). In oral benign lesions associated with HPV, a prevalence of HPV 6 and 11 was observed in squamous cell papilloma (SCP) and condylomas acuminatum, while HPV 2 and 57 were more prevalent in verruca vulgaris lesions. As for focal epithelial hyperplasia (FEH) and oral cancer, especially squamous cell carcinoma (SCC), the prevalence was of HPV 13 and 32, and HPV 16, respectively. The last findings are, nonetheless, controversial. The last findings are, nonetheless, controversial. Showed also discrepancy result the prevalence of human papillomavírus (HPV) in normal oral mucous (latent infection) and in oral cancer, however evidenced confirmatory result in oral benign lesions associated with virus.

¹Pós-graduanda (Doutorado) da Disciplina de Otorrinolaringologia da FCMSCSP, Professora assistente da Disciplina de Otorrinolaringologia da UNCISAL e UFAL.

²Doutorado em Medicina (Otorrinolaringologia), Prof. Dr. da Disciplina de Otorrinolaringologia da FCMSCSP.

Endereço para correspondência: Av. Alvaro Otacílio 3031 ap. 402 Ponta Verde Maceió AL 570335180

Fax: (0xx82) 241-0601 - E-mail: therezitagalvao@superig.com.br

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 11 de março de 2005.

Artigo aceito em 14 de setembro de 2005.

INTRODUÇÃO

O HPV é a abreviatura utilizada para identificar o Papilomavírus humano, causador do condiloma acuminado (do grego kondilus = tumor redondo e do latim acuminare = tornar pontudo)¹.

Os Papilomavírus humanos pertencem a uma grande família de vírus, os papovaviridae. São pequenos, epiteliotrópicos e têm cerca de 55nm de diâmetro. Apresentam um genoma composto de 7200 a 8000 pares de base com peso molecular de 5.2 x 10⁶ daltons. É formado por um capsídeo que possui 72 capsômeros de estruturas icosaédricas, sem envelope lipoprotéico em uma única molécula circular dupla de DNA²⁻⁵.

As infecções pelo papilomavírus humano (HPV) são disseminadas e ocorrem em todo o mundo. Os HPVs infectam a pele e as mucosas e podem induzir a formação de tumores epiteliais benignos e malignos⁶. A infecção é iniciada quando o vírus penetra no novo hospedeiro, através de micro-traumatismos. A progressão da fase de incubação para a de expressão ativa depende de três fatores: da permissividade celular, do tipo de vírus e do estado imunológico do hospedeiro⁷.

A prevalência do HPV na mucosa oral normal (infecção latente) e câncer oral tem gerado resultados conflitantes. A discrepância observada é atribuída, principalmente, à variação da sensibilidade dos métodos empregados e a fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes examinados⁸.

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre a prevalência do papilomavírus humano na cavidade oral e na orofaringe pelos métodos de detecção do HPV, imunohistoquímica, hibridização in situ, hibridização Southern blot e reação em cadeia de polimerase, verificando os tipos de HPV prevalentes na mucosa oral normal (infecção latente), nas lesões benignas da cavidade oral e da orofaringe (papiloma de células escamosas, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal) e no câncer oral.

REVISÃO DA LITERATURA

Métodos de detecção do HPV

O diagnóstico do papilomavírus humano na mucosa oral pode ser suscitado pelo exame clínico da lesão, citologia e biópsia. O aspecto citológico da infecção do HPV caracteriza-se por:

A. Critérios maiores: coilocitos clássicos, halos citoplasmáticos perinucleares e displasia nuclear.

B. Critérios menores: disqueratócitos, metaplasia imatura atípica, macrócitos e binucleação. Este método tem sensibilidade limitada e não tipa o HPV^{9,10}.

Os métodos usados na detecção do DNA do HPV nas lesões variam amplamente na sua sensibilidade e

especificidade¹¹. Estes são divididos em três categorias: os de baixa sensibilidade, que são imunohistoquímica e hibridização in situ, por só detectarem o vírus quando presente em mais de 10 cópias do DNA viral por célula. Os de moderada sensibilidade, que compreendem hibridização Southern blot, dot blot e hibridização dot reversa, por só detectarem o vírus quando de 1 a 10 cópias do DNA viral por célula e o de alta sensibilidade, a reação da polimerização em cadeia, por detectar o vírus em menos de 1 cópia do DNA viral por célula¹².

A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das partículas virais do HPV que se encontram nas lesões vistas na microscopia óptica em material incluído em parafina ou em preparados citológicos, sendo utilizados anticorpos policlonais contra antígenos específicos a vários tipos de HPV⁹. A técnica é prejudicada pela disponibilidade limitada de anticorpos contra tipos de HPV específicos, devido à falta de propagação do vírus in vitro. Os anticorpos comercialmente disponíveis são originados contra antígenos do capsídeo de papilomavírus de bovino, com reação cruzada para HPVs¹³.

Os testes de hibridização são atualmente os métodos de escolha para a detecção do DNA ou RNA do HPV em esfregaços ou amostras de tecidos. São realizados diretamente ou após a amplificação do DNA e RNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O princípio básico destas técnicas de hibridização é a formação dupla entre a fita única de DNA ou moléculas de RNA ou fita dupla de DNA desnaturado derivado de tipos de HPV clonados e a molécula de ácido nucléico viral presente na célula, que representa o alvo do teste de hibridização¹⁰.

A hibridização de Southern blot é utilizada para detecção do DNA do HPV no DNA de biópsias e é considerada como “padrão ouro” para detecção do genoma do HPV. É um teste sensível e altamente específico, consistindo num valioso instrumento de pesquisa, mas não tem aplicação para testes de rotina clínica por ser demorado e trabalhoso¹⁰.

Outro método de hibridização recentemente desenvolvido é a captura híbrida (HCA), que não distingue entre os tipos específicos de HPV e a sua aplicabilidade como método de pesquisa é limitado, mas pode representar um bom teste para o uso clínico de rotina¹⁰.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica que revolucionou a virologia, devido à sua sensibilidade extremamente alta⁵. Caracteriza-se pela amplificação de quantidades diminutas de seqüência de DNA-alvo em diversos milhões de vezes. É um processo térmico cíclico que inclui três etapas: desnaturação onde a fita dupla de DNA é separada em fitas simples; anelamento, onde os iniciadores anelam especificamente com as suas seqüências complementares de DNA-alvo fita simples, e finalmente, a extensão do iniciador, onde um DNA polimerase termoestável gera fitas “filhas” de DNA que atravessam a

região entre dois iniciadores. A partir de então as duplas fitas recém-geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente. Os iniciadores (primers) podem ser: os iniciadores específicos do tipo, que detectam um tipo simples de HPV, ou os iniciadores consensus (também chamados gerais ou genéricos) que detectam um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação¹⁴.

A detecção do HPV pela PCR é geralmente realizada utilizando um dos iniciadores consensus, o MY09-MY¹¹ ou o GP5/GP6^{10,15}. Atualmente, a PCR permite uma avaliação aprofundada dos dados epidemiológicos, incluindo a prevalência de infecções subclínicas ou latente. Entretanto ela tem as seguintes desvantagens: amplificação de quantidades minúsculas de DNA de HPV contaminantes, que podem levar a resultados falsos positivos. Cada método é limitado pela sensibilidade, pela especificidade, pela prática, pelo custo e pela disponibilidade comercial. A avaliação da eficácia de diferentes técnicas para a detecção do HPV é importante e fundamental para o estabelecimento do papel etiológico do HPV nas lesões orais^{10,16}.

Prevalência do papilomavírus humano na cavidade oral e na orofaringe

A prevalência do HPV na cavidade oral e na orofaringe é incerta. Estudos têm demonstrado resultados duvidosos, com avaliação de pequeno número de pacientes e identificação de alguns dos muitos tipos de HPV que são encontrados em lesões de mucosa¹⁷.

Mais de 100 tipos de HPV foram identificados até o presente^{18,19}. Desses, 25 tipos foram associados às lesões orais (HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72 e 73)²⁰.

Para explicar a associação da infecção do HPV com várias lesões orais é importante a investigação da prevalência do HPV na mucosa oral normal.

Prevalência do papilomavírus humano na mucosa oral normal

O papilomavírus na mucosa oral normal deve ser investigado através de estudos sobre a história natural da infecção do HPV na cavidade oral. A prevalência do papilomavírus na mucosa oral normal é controversa²¹.

Observou-se na mucosa oral normal uma grande variação nas taxas detectadas de HPVs em torno de 22% a 60%¹⁷, de 0% até 81.1% em estudos usando vários métodos e com um número limitado de indivíduos, o que parece depender da população a ser examinada e da escolha do método^{16,21}. Foi sugerido que a prevalência do HPV na mucosa oral normal incluiu infecções subclínicas e/ou latentes, e que a infecção com um baixo número de cópias do vírus é comum na cavidade oral⁸.

Na Tabela 1, podem ser observados as técnicas e os resultados obtidos por vários autores quanto à identificação do tipo do HPV na mucosa oral normal.

Prevalência do papilomavírus humano nas lesões benignas (papiloma de células escamosas - PCE, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal (HEF) da cavidade oral e da orofaringe associadas ao vírus).

Papiloma de células escamosas (PCE) oral e da orofaringe. São tumores benignos, que ocorrem principalmente entre os 30 e 50 anos, embora ocorram também abaixo de 10 anos de idade²². Representam cerca de 8% dos tumores orais em crianças²³.

Usualmente, afeta o palato mole, a língua, o freio da língua e o lábio inferior. Na maioria dos casos, os papilomas são únicos e pequenos (<1cm)²⁴. Possuem um crescimento exófitico e aparecem tanto como uma intumescência ovóide de base ampla ou como uma lesão pediculada. A superfície pode apresentar pequenas projeções digitiformes, dando a ela um contorno verrucoso grosseiro. A cor varia desde branca até rosa, dependendo dos graus de queratinização e de vascularização²⁵.

Condiloma acuminado oral e da orofaringe

O condiloma acuminado oral costumava ser considerado uma doença sexualmente transmissível contraída pelo contato oro-sexual. Atualmente a tendência é admitir que o condiloma oral pode ser adquirido não só pelo sexo oral, mas também pela auto-inoculação ou como resultado da transmissão materna^{20,25,26}.

É evidente a semelhança clínica e histológica entre papiloma de células escamosas, condiloma acuminado e verruga vulgar na cavidade oral²⁷. A diferenciação com o PCE é difícil e amplamente acadêmica. Na boca, geralmente se apresentam como pequenos nódulos rosados ou esbranquiçados, que se proliferam em projeções papilares e podem ser pediculados ou sésseis. O contorno da superfície, na maioria dos casos, é mais do tipo “couve-flor” do que de papilomas²⁴. Ocorrem de forma isolada ou múltipla, com frequência na língua, lábio, palato e soalho da boca²⁸.

No trato genital, os termos papiloma e condiloma foram usados separadamente, até o ano de 1970; desde então as duas lesões são chamadas de condilomas. Esta modificação pode também ser aplicada nas lesões orais, porque o papiloma e condiloma contêm os mesmos tipos de HPV encontrados em condilomas genitais²⁰.

O papilomavírus humano foi detectado em lesões orais condilomatosas, inicialmente pela imunohistoquímica, e depois pelas técnicas de hibridização, com positividade que variam de 75% a 85% para HPV 6 e 11^{20,24}.

Zeuss et al.²⁹, em 1991, consideraram o HPV 6 e 11 como sendo os tipos mais frequentemente associados com as lesões orais papilomatosas benignas.

Verruga vulgar oral e da orofaringe

A verruga comum ou vulgar é uma das lesões

Tabela 1. Resultados de vários autores quanto à identificação do HPV na mucosa oral normal.

Ano	Investigador	Técnica	No.P / N o. C	%	Tipo HPV
1992	Kellokoski et al. 29	PCR	18 / 78	(23)	6, 11 e 16(83%), 18(17%)
		SB	33/212	(15)	2,6,11,13,16,18
1992	Jalal et al. 27	PCR	21 / 48	(44)	16
1993	Holladay and Gerald. 25	PCR	1 / 6	(17)	16
1995	Eike et al. 16	PCR	0 / 61	0	-
1995	Mao et al. 34	PCR	4 / 26	(15)	16
1996	Tominaga et al. 76	PCR	3 / 3	(100)	6
		SB	0 / 3	0	-
1996	Cruz et al. 11	PCR	0 / 12	0	-
1996	Mao et al. 35	PCR	0 / 6	0	-
1998	D´Costa et al. 12	PCR	15 / 48	(31)	16
1998	Badaracco et al. 4	PCR	4 / 22	(18)	6(20%),16(50%), 31,11(10%)
1999a	Terai et al. 72	PCR	26/30	(87)	18(87%), 61(60%), 59(23%), 16(7%)
1999	Pillai et al. 51	ISH	0 / 10	0	-
1999	Bustos et al.8	ISH	0 / 33	0	-
2003	Surgyama et al. 64	PCR	16/44	(36)	16

Nº = número; P = positivos; C = casos; ISH = hibridização in situ; SB = hibridização Southern blot; PCR = reação em cadeia de polimerase.

cutâneas mais comuns, especialmente em crianças²⁴. São clinicamente indistinguíveis do PCE e do condiloma, aparecendo como lesão esbranquiçada, séssil, papilomatosa e de superfície grosseira²⁵. Elas estão freqüentemente localizadas nos lábios, palato duro, gengiva e superfície dorsal da língua³⁰. O diagnóstico da verruga oral deve ser restrito a uma lesão apresentando características clínicas e histológicas de uma verruga vulgar da pele, e confirmada pela identificação dos tipos de HPV da verruga cutânea²⁰.

Vários autores demonstraram a presença do vírus em verrugas orais pela imunohistoquímica e testes de hibridização. Observaram uma variação nas taxas detectadas de HPV de 43% a 100% em verrugas orais^{29, 31,32}.

A prevalência do HPV nas verrugas orais parece ser pelo HPV 2, seguido do HPV 57, embora ainda sejam necessários mais estudos na identificação do amplo espectro da infecção oral causada pelos tipos de HPV cutâneos^{20,33}.

Na Tabela 2, são observados as técnicas e os resultados dos estudos de papilomas, condilomas e verrugas na cavidade oral e na orofaringe.

Hiperplasia epitelial focal (HEF) oral

O termo hiperplasia epitelial focal (HEF) ou doença de Heck foi, inicialmente, introduzido por Archard et al.³⁴ em 1965, para descrever elevações nodulares múltiplas da mucosa oral observada entre esquimós do Alasca e índios da América do Norte e Sul. Raramente observado

em caucasiano³⁵. Tem sido descrito também em Israel, África do Sul e Suécia³⁶.

É uma lesão benigna, que pode se localizar na mucosa oral, lábios e língua, e mais notadamente no lábio inferior^{24,37,38}. Clinicamente, é caracterizada por pápulas múltiplas, indolores e amolecidas, de coloração variável entre rosa pálido à cor normal da mucosa. Uma forte história familiar foi sugerida por diversos autores^{24,25,50}.

A etiologia viral tem sido demonstrada inicialmente pela imunohistoquímica, posteriormente pelas técnicas de hibridização com a identificação dos HPVs 13 e 32, os quais foram detectados em 75-100% dos casos³².

Os HPVs 13 e 32 foram considerados específicos da hiperplasia epitelial focal, porém o HPV 32 foi também encontrado em outras lesões orais, mas nunca fora da cavidade oral^{36,39,40}.

Os estudos e seus resultados podem ser observados na Tabela 3.

Prevalência do papilomavírus humano no câncer oral e na orofaringe

Lamentavelmente, o câncer oral ainda tem uma alta taxa de mortalidade. A sua taxa de incidência varia de uma região para outra, apresentando elevadas taxas na Índia, Sri Lanka, Vietnam, Filipinas, Hong Kong e Taiwan, onde cerca de 30% de todos os cânceres ocorrem na região da orofaringe. A Índia tem aproximadamente 56.000 novos casos a cada ano, e provavelmente está entre as mais altas taxas de incidência do mundo⁴¹.

Tabela 2. Resultados de vários estudos quanto à identificação do HPV em papilomas (incluindo condiloma e verruga) na cavidade oral e na orofaringe.

Ano	Investigador	Lesão	Técnica	No. P/ N o. C	%	Tipo HPV
1986	Adler-Storhthz et al. ⁷⁸	Verruga	IHQ	6 / 11	(55)	HPV +
			ISH	6 / 11	(55)	2 (83%), 4 (17%)
1986	Syrjänen. ⁶⁸	Papiloma	ISH	6 / 7	(85.5)	6(33.5%) 11(66.5%)
			IHQ	4 / 7	(57)	HPV +
1986	Syrjänen. ⁶⁸	Condiloma	ISH	2 / 2	(100)	6(50%) e 11(50%)
			IHQ	2 / 2	(100)	HPV +
1987	Eversole et al. ¹⁸	Condiloma	IHQ	5 / 20	(25)	HPV +
			ISH	18/ 20	(90)	6, 11 (85%), 2(5%)
1991	Zeuss et al. ⁸¹	Papiloma	ISH	4 / 30	(13)	6 e 11
1991	Zeuss et al. ⁸¹	Condiloma	ISH	15/15	(100)	6 e 11
			ISH	11 / 15	(73)	6 ,11, 16, 18, 31, 33, 35
1991	Zeuss et al. ⁸¹	Verruga	ISH	5 / 5	(100)	6 e 11
1991	Young et al. ⁷⁹	Papiloma	ISH	13 /21	(62)	6, 11
			ISH	10 / 13	(77)	16, 18, 31, 33, 35
1994	Padayachee et al. ⁴⁶	Verruga	IHQ	12 / 21	(57)	HPV+
			ISH	15 / 21	(71)	2 e 57 (87%), 2 (13%)
1995	Padayachee et al. ⁴⁷	Verruga	ISH	14 /19	(74)	2
			ISH	12 / 19	(63.5)	57
			PCR	8 /19	(43)	2, 57
1996	Tominaga et al. ⁷⁶	Condiloma	PCR	1 / 8	(13)	6
1998	Bishop et al. ⁶	Condiloma	ISH	1 / 1	(100)	6 e 11
1998	Badaraccoe	Condiloma	PCR	7 / 7	(100)	6, 31, 57, 56, 44, 16
1999b	Terai et al. ⁷³	Verruga	IHQ	1 / 1	(100)	HPV+
			ISH	1 / 1	(100)	2
			SB	1 / 1	(100)	2

Nº= número; P = positivos; C = casos; IHQ = imunohistoquímica; ISH =hibridização in situ; SB = hibridização Southern blot; PCR = reação em cadeia de polimerase; HPV+ = papilomavírus humano positivo.

Tabela 3. Resultados de vários autores quanto a identificação do HPV na hiperplasia epitelial focal na cavidade oral e na orofaringe.

Ano	Investigador	Técnica	No.P / N o. C	%	Tipo HPV
1984	Syrjänen ²⁷	IHQ	1 / 1	(100)	HPV +
1987	Hernandez-Jauregui et al. ³⁵	SB	7 /7	(100)	13
1989	Garlick et al. ³⁷	SB	4 /4	(100)	13(75%), 32(25%)
1989	Henke et al. ³⁸	ISH	16 / 17	(95)	13(59%), 32(35%)
1991	Padayachee & Van Wyk ³⁶	IHQ	7 / 18	(39)	HPV +
		ISH	15 / 18	(83)	32 (60%), 13 (33%) 11(7%)
2002	Schwenger et al. ⁷⁶	PCR	5 / 5	(100)	13(20%) e 32(60%)

Nº= número; P = positivos; C = casos; IHQ = imunohistoquímica; ISH =hibridização in situ; SB = hibridização Southern blot; PCR = reação em cadeia de polimerase; HPV + = papilomavírus humano positivo.

Tabela 4. Resultados de vários autores quanto à identificação do HPV no carcinoma oral.

Ano	Investigador	Lesão	Técnica	No. P/ N o. C	%	Tipo HPV
1985	De Villiers et al. ⁷⁵	CCE	SB	3 / 7	(43)	2, 16
1986	Syrjñänen ⁶⁸	CCE	ISH	1 / 2	(50)	16
			IHQ	0 / 2	0	-
1991	Zeuss et al. ²⁹	CCE	ISH	0 / 15	0	-
1991	Young et al. ⁵⁴	CCE	ISH	0 / 17	0	-
		CV	ISH	0 / 10	0	-
1993	Holladay & Gerald. ⁷³	CCE	PCR	7 / 37	(19)	16 e 18
1993	Noble-Topham et al. ⁵⁷	CV	PCR	12 / 25	(48)	6,11(10%), 16(20%) 18(84%)
1994	Ostwald et al. ⁶¹	CCE	PCR / SB	16 / 26	(62)	16(45%), 18(35%) 6,11 (15%)
1995	Balaram et al. ⁴⁶	CCE	PCR	67 / 91	(74)	6(13%), 11(20%), 16(42%), 18(47%)
		CV	PCR	10 / 15	(67)	6(10%), 11(20%), 16, 18(60%)
1996	González-Moles et al. ⁷²		CCE	PCR	11 / 37	(30)
1996	Snijders et al. ⁵³	CCE	PCR	7 / 32	(22)	16
1996	Cruz et al. ⁷¹	CCE	PCR	19 / 35	(55)	16(79%), nd (21%)
1998	Mineta et al. ⁷⁰	CCE	PCR	3 / 14	(21)	16
1998	Wilczynski et al. ⁶²	CCE	PCR	14 / 21	(64)	16(80%), 33(10%), 59(10%)
1998	Premoli-de-Percocho et al. ⁶⁹	CCE	ISH	35 / 50	(70)	16 e 18 (80%), 16, 18, 6 e 11(20%)
1998	Miguel et al. ⁶⁰	CCE	PCR	2 / 27	(8)	16
1998	Elamin et al. ⁵⁵	CCE	PCR	14 / 28	(50)	16(43%), 16 e 6(36%), 6(21%)
1998	D´Costa et al. ⁶⁶	CCE	PCR	15 / 100	(15)	
1998	Koh et al. ⁶⁷	CCE	PCR / SB	22 / 42	(52)	16(68%),18 (27.5%) 33(18.5%)
1999	Bustos et al. ⁵⁶	CCE (3/9) CV (5/9) Melanoma (1/9)	ISH	09 / 33	(27)	16
2002	Kojima et al. ¹⁸	CCE	PCR	35 / 53	(66)	38
2003	Sugiyama et al. ⁶³	CCE	PCR	30 / 86	(35)	16

Nº = número; P = positivos; C = casos; IHQ = imunohistoquímica; ISH = hibridização in situ; SB = hibridização Southern blot; PCR = reação em cadeia de polimerase; nd = não determinado; CV = carcinoma verrucoso; CCE = carcinoma de células escamosas.

É uma doença que acomete os pacientes em torno de 50 anos, mas evidente entre 60 e 70 anos de idade. O câncer oral inclui as neoplasias malignas das regiões dos lábios, intra-oral e orofaríngea⁴². O câncer oral é um grave e crescente problema de saúde pública no Brasil, correspondendo a 4% de todos os tipos de câncer, ocupando o oitavo lugar entre os tumores que acometem o homem e o décimo primeiro entre as mulheres⁴³.

A localização mais comum na faringe corresponde

aos cânceres na orofaringe, principalmente nas tonsilas palatinas. Entretanto, o câncer lingual compreende 30% destes cânceres⁴⁴. Aproximadamente 90% destas lesões são localizadas em tecidos moles e se originam de epitélio escamoso²⁰.

O cigarro e o álcool são considerados os principais causadores do câncer oral. Atuam de forma sinérgica e têm efeito dose-dependente^{12,17}. Uma parte da população, porém, desenvolve o câncer oral sem exposição a estes

fatores de risco, sugerindo outras causas, como: predisposição genética, dieta e agentes virais, em particular o vírus HPV^{3,45}.

A presença simultânea dos agentes químicos e da infecção do HPV na mucosa oral pode favorecer a transformação maligna⁴⁶. Entretanto, a participação do HPV como agente etiológico no câncer oral é menor que o consumo do cigarro e álcool porque a prevalência da infecção do HPV é menor que a prevalência do consumo do cigarro e álcool na gênese do câncer oral^{20,47}.

Syrjänen et al.⁴⁸, em 1983, sugeriram que o HPV pode estar envolvido no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas da cavidade oral, ao descreverem alterações citopáticas do HPV em cânceres orais, idênticas àquelas previamente encontradas em carcinoma do colo uterino, embora ainda seja necessária maior comprovação confirmatória por outras técnicas de hibridização do DNA.

Vários estudos evidenciaram o HPV 16 como o tipo mais prevalente no câncer oral, assim como no câncer anogenital^{24,25,49}.

Miller & Johnstone⁴⁷, em 2001, numa meta-análise, confirmaram uma elevação do HPV nas displasias e carcinomas epiteliais orais em comparação com a mucosa oral normal, principalmente dos genótipos de alto risco. Os resultados indicaram o HPV como um fator de risco independente para o carcinoma oral de célula escamosa.

Herrero et al.⁵⁰, em 2003, estudando o HPV no câncer oral, observaram uma frequência maior do HPV 16 na cavidade oral e na orofaringe entre os pacientes com mais de um parceiro sexual e/ou que praticavam sexo oral, enquanto a menor frequência foi entre os pacientes tabagistas.

De acordo com vários estudos, a taxa de prevalência do HPV no câncer oral variou de 0-100%^{17,25,29,51-54}. Esta variação tão ampla na taxa de detecção do HPV é explicada pelos diferentes métodos de detecção utilizados na pesquisa do HPV²⁵.

Uma das maiores dificuldades em detectar o HPV no câncer oral é a presença deste vírus em apenas uma sub-população de células e o pequeno número de cópias detectado destas células infectadas. Por essa razão são requeridos métodos de detecção de alta sensibilidade⁵⁵.

Carcinoma verrucoso

O carcinoma verrucoso foi primeiro descrito como uma variante do carcinoma de células escamosas que tem origem na cavidade oral.

Conhecido também como tumor de Ackerman's. Seu crescimento é exofítico, lento e invasivo apenas superficialmente, com baixo índice de metástase e pode ser tratado com simples excisão. A presença do HPV no carcinoma verrucoso tem sido relatada por vários autores^{20,32,46,56-58}.

Carcinoma de células escamosas (CCE)

Compreende aproximadamente 95% de todos os cânceres orais. Seu aspecto clínico varia de um tumor nodular até uma úlcera crônica. A presença do HPV no CCE é mostrada por vários pesquisadores^{18,59-62}. Inicialmente pelo estudo microscópico, pela imunohistoquímica e mais recentemente pelos testes de biologia molecular²⁰.

Estudos enfocaram a importância do papel do HPV no carcinoma da cabeça e pescoço, como também sugerem que o HPV 16 possa estar envolvido no desenvolvimento de algum carcinoma oral^{56,60,63}.

Na Tabela 4 podem ser observados estudos de carcinoma oral com seus resultados e técnicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Por meio da base de dados MEDLINE e por livros didáticos, foram pesquisados artigos da literatura médica inglesa e portuguesa, de janeiro de 1990 a dezembro de 2003, que relataram sobre a prevalência do HPV pelos métodos de detecção do vírus (imunohistoquímica e exames de biologia molecular) na mucosa oral normal, nas lesões benignas associadas ao vírus (papiloma de célula escamosa, condiloma, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal) e no câncer oral.

No MEDLINE, as palavras-chave detection, human papillomavirus oral, Polymerase Chain Reaction, human papillomavirus, oral cavity, normal oral cavity, oral lesions, papillary lesions, oral condyloma acuminatum, oral warts, oral focal epithelial hyperplasia, oral cancer, squamous cell carcinomas, entre outras, foram usadas isoladamente e em combinação na pesquisa.

A partir da seleção destes trabalhos científicos, foram incluídos também alguns artigos de grande importância sobre HPV oral, publicados em anos anteriores ao período estabelecido na pesquisa.

DISCUSSÃO

A prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe é considerada incerta, pois diversos estudos mostram resultados discrepantes com uma estimativa de pequeno número de pacientes, e pouca identificação entre os muitos tipos de HPV encontrados em lesões de mucosa¹⁷.

O diagnóstico do HPV na mucosa oral e na orofaringe pode ser suspeitado pelo exame clínico da lesão, citologia e biópsia, porém são os exames de biologia molecular que são capazes de detectar o DNA do HPV na célula, destacando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) como a técnica mais sensível para pesquisar o HPV. Entretanto, é importante e fundamental para estabelecer o papel etiológico do HPV nas lesões orais a avaliação da eficácia das diferentes técnicas para a detecção do HPV¹⁶.

Na Tabela 1, observa-se uma prevalência do HPV 16 na mucosa oral normal em 16 resultados de 14 autores, pelos métodos de detecção, SB, ISH e PCR, compreendendo 56% de todos os resultados, o que parece depender da população a ser examinada e da escolha do método para detectar o HPV^{21,16}.

Ainda na Tabela 1, observam-se 6 resultados negativos, obtidos pelas técnicas ISH, SB e PCR, os quais compreendem 40% do total dos resultados pesquisados. Provavelmente se deva ao pequeno número de amostras utilizadas nas pesquisas e a dificuldade em detectar o HPV nas amostras de biópsia e swabs.

Dentre os fatores que geram controvérsias sobre a prevalência do HPV na mucosa oral normal, observados na Tabela 1, podemos destacar a grande variação nas taxas detectadas de HPV, de 0% a 100% apesar do uso de métodos mais sensíveis como a PCR; outro fator é a relação entre os resultados e o tamanho das amostras, que variaram de 3 amostras com 100% de positividade para o HPV no estudo de Tominaga et al.⁶⁴, 1996, chegando até 212 amostras com 15% de detecção de HPV no estudo de Kellokoski et al.⁶⁵, 1992, evidenciando assim uma enorme discrepância entre os resultados, o que provavelmente se deve a falhas nos métodos de detecção do HPV ou na colheita do material ou, então, por desconhecermos ainda o percurso exato da infecção do HPV na mucosa oral normal^{32,13,16}.

A prevalência do papilomavírus humano nas lesões benignas (papilomas de células escamosas, condilomas e verruga vulgar) da cavidade oral e da orofaringe em 25 resultados de 14 autores foi dos HPV 6 e 11, em papilomas e condilomas, através dos métodos IHQ, ISH e PCR, e nas verrugas orais, a prevalência foi dos HPV 2 e 57, pelos métodos IHQ, ISH, HSB e PCR, com um predomínio para o HPV 2. É evidente a presença do HPV em todos os casos, variando de 13% a 100% de positividade, com seus tipos prevalentes conforme a lesão, independente dos métodos utilizados. Provavelmente isso se deva por estas lesões apresentarem um maior número de células contendo o DNA do HPV. Observa-se também o predomínio dos HPV de baixo risco, principalmente o HPV 6 e 11 justificado por serem os tipos mais freqüentemente associados com as lesões orais papilomatosas benignas²⁹, enquanto os de alto risco, como o HPV 16, só apareceram em 3 resultados.

Na Tabela 3, a prevalência do HPV na hiperplasia epitelial focal oral em 7 resultados de 6 autores foi dos HPV 13 e 32, através dos vários métodos de detecção, IHQ, ISH, HSB e PCR, com uma variação nas taxas de detecção do HPV de 39% a 100%. Observou-se também que todos os resultados foram HPV positivo, sendo 2 casos sem identificação do HPV, justificado pelo uso da técnica IHQ, o que torna evidente a presença do HPV nesta doença.

Na Tabela 4, observa-se uma variação nas taxas detectadas de HPV de 0% a 74% em 24 resultados de câncer oral de 21 autores; provavelmente se deve aos diferentes métodos de detecção com diferentes sensibilidades e ao tamanho das amostras utilizadas nas pesquisas, de 2 a 100 amostras. Outro fator são as dificuldades em detectar o HPV no câncer oral, devido à presença deste vírus em apenas uma subpopulação de células e ao pequeno número de cópias detectado destas células infectadas⁵⁵.

Ainda na Tabela 4, constata-se uma alta prevalência do HPV 16, através das técnicas ISH, HSB e PCR, estando presente em 80% de todos os resultados. As taxas detectadas de HPV 16 variaram de 8%, ou seja 2 resultados positivos nas 27 amostras do estudo de Miguel et al.⁶⁰ (1998), chegando a 80% dos 14 resultados positivos, nas 21 amostras do estudo de Wilczynski et al.⁶² (1998), o que sugere uma enorme discrepância entre os resultados. Observaram-se também 4 resultados negativos para HPV pelas técnicas IHQ e ISH, que provavelmente se deva à baixa de sensibilidade destas técnicas em relação a PCR e ao pequeno número de amostras. Por isso, requer mais estudos com utilização de diferentes métodos de detecção do HPV para maior confirmação do vírus no câncer oral.

A prevalência do HPV 16 no câncer oral em vários estudos na Tabela 4 não prova que o vírus seja responsável pela doença, mas mostra que pode contribuir para o aparecimento do câncer oral, principalmente no grupo de pacientes não-tabagistas e não-estilistas^{3,45}, ou mesmo na presença simultânea de agentes químicos e da infecção do HPV pode levar à transformação maligna.

Outros fatores que contribuem para aumentar a prevalência do papilomavírus humano na cavidade oral e na orofaringe são: a queda da defesa imunológica do paciente para com o vírus⁶⁶, a presença de mais de um parceiro sexual e a prática de sexo oral⁵⁰, o que aumentam as chances de infecção do HPV e sua recorrência.

A prevalência do HPV 16, encontrada nos resultados de câncer oral (Tabela 4) e da mucosa oral normal (Tabela 1), sugere ser o HPV 16 o mais prevalente na cavidade oral e na orofaringe. A comparação da prevalência do HPV entre as Tabelas 1 e 4 valorizaria a relação do HPV na gênese de determinada neoplasia. Contudo, os resultados observados nas tabelas geram controvérsias, as quais são atribuídas, principalmente, à variação da sensibilidade dos métodos empregados, bem como à diversidade das populações estudadas, e ao tamanho das amostras.

CONCLUSÃO

A análise da literatura sobre a prevalência do HPV na cavidade oral e orofaringe permite as seguintes conclusões:

1. Dentre as técnicas utilizadas no diagnóstico do HPV, a mais sensível é a PCR;
2. A prevalência do HPV, na mucosa oral normal,

apresenta resultados discrepantes;

3. A prevalência do HPV, nas lesões benignas associadas ao vírus, é confirmada;

4. No câncer oral, apesar da prevalência do HPV 16, ainda existe controvérsias com relação à presença do vírus e à carcinogênese oral;

5. Desta forma, são necessários mais estudos com aperfeiçoamento dos métodos utilizados para a detecção do DNA HPV e das técnicas de coletas das amostras (swabs ou biópsia), objetivando menor interferência nos resultados e maior esclarecimento sobre a infecção do HPV, e sua prevalência na cavidade oral e orofaringe, ficando a motivação para continuar a pesquisar o HPV, principalmente, na mucosa oral normal e no câncer oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Perez M, Gil AO, Wroclawski ER, Guidi HG, Schiavini JL, Carvalho JJ. HPV no homem. In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1ª edição, São Paulo: BG Cultural; 2000. 4: 7-16.
- Alvarenga GC, Sá EM, Passos MR, Pinheiro VM. Papilomavírus Humano e carcinogênese no colo do útero. J Bras Doenças Sex Transm 2000; 12(1): 28-38.
- Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. Mod Pathol 2000;13(6): 644-53.
- Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV). In: I Consenso Brasileiro de HPV, nº1, São Paulo: BG Editora; 2000. 1: p. 01-06.
- Oliveira MC, Soares RC, Pinto PL, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. Rev Bras Otorrinolaringol 2003; 69(4): 553-9.
- Lancellotti CLP, Levi JE, Silva MALG, Schwarzschild M, Nicolau SM. Diagnóstico laboratorial. In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1ª edição, São Paulo: BG Cultural; 2000. 4: 45-60.
- Zahm DM, Nindl I, Schneider A. Princípios gerais do diagnóstico: detecção do papilomavírus humano. In Gross GE, Barrasso R. Infecção por papilomavírus humano: Atlas clínico.
- De Villiers EM. Human Pathogenic Papillomavirus Types: an update. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 1-12.
- Miller CS, White DK, Ky L. Human papillomavirus in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; 82(1): 57-68.
- Sousa TRB. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma epidermóide da cavidade oral: revisão da literatura. São Paulo, 2001. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).
- Ribeiro KMX. Estudo da ocorrência do Papilomavírus humano em tonsilas palatinas na população pediátrica. São Paulo, 2002, p. 01-39 (tese de mestrado - Escola Paulista de Medicina).
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. J of Clinical Microbiology 2000; 357-61.
- Terai M & Takagi M. Human Papillomavirus in Oral Cavity. Oral Med Pathol 2001; 6: 1-12.
- Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human Papillomavirus and Risk of Oral Cancer. Laryngoscope 1998; 108: 1098-103.
- Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncology 2002; 38: 591-6.
- Terai M & Burk R. Complete Nucleotide Sequence and Analysis of a Novel Human Papillomavirus (HPV 84) Genome Cloned by an Overlapping PCR Method. Virology 2001; 279: 109-15.
- Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. Med Microbiol Immunol 2003; 192: 123-8.
- Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. Oral Microbiol Immunol 1999a; 14: 201-5.
- Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985; 60: 166-74.
- Pignatari SS, Weekx LL, Bordasch A. Biologia Molecular no Diagnóstico das Infecções por Papilomavírus Humano (HPV) em Otorrinolaringologia. Rev Bras De Otorrinolaringologia 1995; 61(2): 91-5.
- 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.
- Syrjänen S. Cavidade oral e trato respiratório superior: diagnóstico e tratamento. In: Gross GE, Barrasso R. Infecção por papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV, 2ª Edição. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda. 1999. 12: 399-409.
- Zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. Biochimica et Acta. 1996; 1288: 55-78.
- Syrjänen S, Syrjänen K, Ikenberg H, Gissmann L, Lamberg M. A human papillomavirus closely related to HPV 13 found in a focal epithelial hyperplasia lesion (heck disease). Arch Dermatol Res 1984; 276: 199-200.
- Suskind DL, Mirza N, Risin D, Stanton D, Sachdeva R. Coudyloma Acuminatum Presenting as a Base of tongue mass. Otolaryngology Head and Neck Surgery, 1996; 114 (3): 487-90.
- Zeuss MS, Miller CS, Wite DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71: 714-20.
- Nassif Filho AC, Boros LF, Júnior JB. Infecção da cavidade oral pelo papilomavírus humano. In Campos CA e Costa HO. In: Tratado de otorrinolaringologia (SBORL), 1ª edição, São Paulo: Ed. Roca; 2003. 3(34): 314-16.
- Padayachee A. Human papillomavirus (HPV) types 2 and 57 in oral verrucae demonstrated by in situ hybridization. J Oral Pathol Med 1994; 23: 413-7.
- Praetorius F. HPV - Associated diseases of oral mucosa. Clin dermatol 1997; 15(3): 399-413.
- Padayachee A, Sanders CM, Maitland NJ. A polymerase chain reaction (PCR) investigation of oral verrucae which contain HPV types 2 and 57 by in situ hybridization. J Oral Pathol Med 1995; 24: 329-34.
- Archard HO, Heck JW, Standly HR, Gallup NM. Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosal lesion found in Indian children. Oral Surg 1965; 20: 201-12.
- Hernandez-Jaurequi P, Eriksson A, Perez RT et al. Human papillomavirus type 13 DNA in focal epithelial hyperplasia among Mexicans. Arch Virol 1987; 93: 131-7.
- Padayachee A & Van Wyk CW. Human papillomavirus (HPV) DNA in focal epithelial hyperplasia by in situ hybridization. J Oral Pathol Med 1991; 20: 210-4.
- Garlick JÁ, Calderon S, Buchner A, Mitrani-Rosenbaum S. Detection of human papillomavirus in focal epithelial hyperplasia. J Oral Pathol Med 1989; 18: 172-7.
- Henke R-P, Guérin-Reverchon I, Milde-Langosch K, Strömme-Koppang H, Löning T. 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.
39. De Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63(11): 4898-903.
 40. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Kataja V, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Acetwhite staining and its significance in diagnosis of oral mucosa lesions in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 278-83.
 41. Pillai MR, Phanidhara A, Kesari AI, Nair P, Nair MK. Cellular Manifestations of Human Papillomavirus Infection in the Oral Mucosa. *Journal of Surgical Oncology* 1999; 71: 10-15.
 42. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. *Oral Oncology* 2001; 37: 401-18.
 43. Soares PC, Malavazi I, Reis RI, Neves KA, Zuanon JAS, Neto CB, et al. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35(5): 439-44.
 44. Spitz MR. Epidemiology and Risk Factors for Head and Neck cancer. *Seminars in Oncology* 1994; 21: 281-8.
 45. Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology* 2002; 38: 227-33.
 46. Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, et al. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers - high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* 1995; 61: 450-4.
 47. Miller CS & Johnstone BM. Human Papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(6): 622-35.
 48. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S and Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int. J. Oral Surg* 1983; 12: 418-24.
 49. IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64, Human papillomaviruses. Lyon 1995. p. 114-7.
 50. Herrero R, Castellangue X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P. Human papillomavirus and oral cancer: the international Agency for Research on cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Int* 2003; 95(23): 1772-83.
 51. Eike A, Buchwald C, Rolighed J. Human papillomavirus (HPV) is rarely present in normal oral and nasal mucosa. *Clin Otolaryngol* 1995; 20: 171-3.
 52. Mao E-J. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995; 80: 320-9.
 53. Snijders PJF, Scholes AGM, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Field JK. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 1996; 66: 464-9.
 54. Young SK, Min KW. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71:726-9.
 55. Elamin F, Steingrimsdottir S, Wanakulasuriya N, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncology* 1998; 34: 191-7.
 56. Pavan JV et al. Detection Del vírus papiloma humano em lesões cancerosas orais em la ciudad de Córdoba. *Rev Fac Cienc Méd Córdoba* 1999; 56(1): 65-71.
 57. Noble-Topham SE, Fliss DM, Hartwick WJ, McLachlin CM, Freeman JL, Noyek AM. Detection and typing of human papillomavirus in verrucous carcinoma of the oral cavity using the polymerase chain reaction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1299-304.
 58. Saruf MJB, Dias EP. Avaliação Citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV). *J Bras Doenças Sex Trans* 1997; 9(2): 4-18.
 59. Mao E-J, Schwartz SM, Daling JR, Oda D, Tickman L, Beckmann AM. Human papilloma viruses and p53 mutations in normal pre-malignant and malignant oral epithelia. *Int J Cancer* 1996; 69: 152-8.
 60. Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg* 1998; 176(5): 428-9.
 61. Ostwald C, Müller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Löning T. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 220-5.
 62. Wilczynski SP, Lin Bty, Xie Y, Paz IB. Detection of Human Papillomavirus DNA and Oncoprotein Overexpression Are Associated with Distinct Morphological Patterns of Tonsillar Squamous Cell Carcinoma. *American J of Pathology* 1998; 152(1): 145-56.
 63. Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Shigehiro O, et al. Detection of papillomavirus- 16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* May 2003; 95(5): 594-600.
 64. Tominaga T, Fukushima K, Nishizaki K, Watanabe S, Masuda Y, Ogura H. Presence of Human Papillomavirus Type 6f in Tonsillar Coudyloa Acuminatum and Clinically Normal Tonsillar mucosa. *Jpn J Clin Oncology* 1996; 26: 393-7.
 65. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang 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.
 66. Bishop JW, Emanuel JM, Sims KL. Disseminated Mucosal Papilloma/ Condyloma Secondary to Human Papillomavirus - The American journal of Pathology 1998; 22(10): 1291-5.
 67. Koh JK, Cho NP, Kong G, Lee JD, Yoon K. p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. *Br J Cancer* 1998; 78: 354-9.
 68. D'Costa J, Sarannath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta AR. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol* 1998; 34: 413-20.
 69. Primoli-De-Percoco G, Ramirez JL, Galindo I. Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 86: 77-81.
 70. Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, et al. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18(6b): 4765-8.
 71. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B: 5-62.
 72. González-Moles MA et al. Presencia de secuencias de papilomavirus humanos 16 en los carcinomas orales de células escamosas. *Medicina Oral* 1996; 1: 79-84.
 73. Holladay EB, Gerald WL. Viral gene detection in oral neoplasms using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1993; 100(1): 36-40.
 74. Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Lamberg MA. Detection of papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol*. 1986; 62: 660-7.
 75. De Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in tongue carcinomas. *Int J cancer* 1985; 36: 575-8.
 76. Schwenger JU, Von Buchwald C, Lindeberg H. Oral focal epithelial hyperplasia. Any risk of confusion with oral condylomas? *Ugeskr Laeger* 2002; 169(37): 4287-90.
 77. Eversole LR, Laipis PJ, Merrell P, Choi E. Demonstration of human papillomavirus DNA in oral condiloma acuminatum. *J Oral Pathol* 1987; 16: 266-72.
 78. Adler-Storzh K, Newland JR, Tessin BA, Yeudall WA, Shillitoe EJ. Identification of human papillomavirus types in oral verruca vulgaris. *J Oral Pathol* 1986; 15: 230-3.

-
79. Badaracco G, Venuti A, Di Lonardo A, Scambia G, Mozzetti S, Benedetti Panici P et al. Concurrent HPV infection in oral and genital mucosa. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 130-4. Munksgaard.
80. Jalal H, Sanders CM, Prime SS, Scully C, Maitland NJ. Detection of human papilloma virus type 16 DNA in oral squames from normal young adults. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 465-70.
81. Villa LL & Franco ELF. Epidemiologic Correlates of Cervical Neoplasia and Risk of Human Papillomavirus Infection in Asymptomatic Women in Brazil. *J National Cancer Institute* 1989; 81(5): 332 -40.
82. Terai M, Takagi M, Matsukura T, Sata T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. *J Oral Pathol Med* 1999b; 28: 137-40.