



Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

Comparative study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions ☆,☆☆

Marise da Penha Costa Marques^{a,b,*}, Ivo Bussoloti Filho^{a,c}, Lia Mara Rossi^{a,d}, Maria Antonieta Andreoli^e, Natália Oliveira Cruz^a

^a Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), São Paulo, SP, Brasil

^b Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Departamento de Otorrinolaringologia, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^d Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, SP, Brasil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 13 de abril de 2014; aceito em 8 de outubro de 2014

KEYWORDS

Polymerase chain reaction;
Human papillomavirus DNA tests;
Mouth;
Oropharynx

Abstract

Introduction: Many epidemiological studies have suggested that human papillomavirus (HPV), especially type 16, is involved in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx, especially in young, non-smoking patients; thus, its detection in lesions in this region is important.

Objective: To clarify the capacity of the brushing sampling method to detect the presence of HPV in oral or oropharyngeal lesions through polymerase chain reaction (PCR) testing, and to compare the results with those obtained by biopsy.

Methods: Prospective study of adult patients with oral or oropharyngeal lesions assessed by PCR, comparing biopsy specimens with samples obtained by the brushing method. The study was approved by the Research Ethics Committee of the institution.

Results: A total of 35 sample pairs were analyzed, but 45.7% of the brushing samples were inadequate (16/35) and, thus, only 19 pairs could be compared. There was agreement of results in

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.08.007>

* Como citar este artigo: Marques MPC, Bussoloti Filho I, Rossi LM, Andreoli MA, Cruz NO. Comparative study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81:598-603.

** Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: mariseorl@globo.com (M.P.C. Marques).

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt>).

PALAVRAS-CHAVE

Reação de polimerase em cadeia;
Testes de DNA para papilomavírus humano;
Boca;
Orofaringe

94.7% (18/19) of the pairs, with HPV identified in 16 of them. HPV DNA was detected in 8.6%(3/35) of biopsy and 5.7% (2/35) of brushing samples.

Conclusion: There was no statistically significant difference between the two methods, but the brushing sampling method showed a higher number of inadequate samples, suggesting that it is an unreliable method for surveillance.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY- license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Estudo comparativo entre biópsia e escovado na pesquisa do papilomavírus humano em lesões de cavidade oral e de orofaringe

Resumo

Introdução: Muitos estudos epidemiológicos indicam a participação do papilomavírus humano, especialmente o tipo 16, na carcinogênese dos tumores espinocelulares das cavidade oral e orofaríngea, principalmente em jovens e não fumantes, sendo portanto importante sua detecção nas lesões desta região.

Objetivo: Elucidar a habilidade do escovado em detectar o papilomavírus humano, pela reação em cadeia da polimerase, nas lesões orais e orofaríngeas, comparando os resultados com os obtidos por biópsia.

Método: Estudo prospectivo de pacientes com lesões orais e orofaríngeas, pela reação em cadeia da polimerase, no qual foram pareados os resultados de amostras obtidas por escovado e por biópsia. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

Resultado: Foram analisados 35 pares de amostras, porém estavam inapropriadas para análise 45,7% (16/35) das amostras obtidas por escovado, e portanto, somente 19 pares puderam ser comparados. Em 94,7% dos pares houve concordância dos resultados, sendo encontrado o papilomavírus humano – 16 em um destes pares. O ácido desoxirribonucleico do papilomavírus humano foi detectado em 8,6% (3/35) das biópsias e em 5,7% (2/35) dos escovados.

Conclusão: Não houve diferença estatística entre os métodos, mas como houve um grande número de amostras obtidas por escovado inapropriadas, este parece não ser confiável para o rastreamento.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt>).

Introdução

O carcinoma espinocelular (CEC) constitui mais de 80% dos carcinomas da boca e da orofaringe, e a sua incidência vem aumentando nos últimos trinta anos na região da cabeça e do pescoço, especialmente em pacientes não fumantes e com idade inferior a 45 anos.¹⁻⁴ Syrjänen et al. (1983), em analogia ao carcinoma de colo uterino, foram os primeiros a sugerir que o papilomavírus humano (HPV) também poderia estar envolvido nesta carcinogênese e, desde então, muitas pesquisas têm sido feitas para conhecer a prevalência do HPV na boca e na orofaringe, tanto em pacientes com lesão, quanto naqueles sem lesão.^{1,2,5,6}

Pelo exposto, parece ser importante para a prevenção dos CEC da região da cabeça e do pescoço estabelecer uma forma de rastreamento acessível e confiável da infecção clínica ou subclínica pelo HPV de alto risco nas mucosas oral e orofaríngea. Os métodos de detecção do HPV nos CEC da boca e da orofaringe têm grandes variações na sensibilidade e na especificidade, com a prevalência oscilando entre 0 e 78%, por isso é muito importante a escolha de um método que possua alta sensibilidade e especificidade para a detecção do HPV.

Atualmente, a metodologia mais utilizada é a hibridização reversa utilizando *primers* degenerados marcados com biotina, presentes em *kits* comerciais que permitem a genotipagem da maioria dos tipos de HPV de alto e baixo riscos. São muitos os aspectos que podem interferir na detecção viral, tais como: localização da lesão, presença ou não de queratinização, tipo de amostra colhida e procedimento de colheita (forma de colher, de conservar e de extrair a amostra), além dos métodos utilizados na detecção.^{2,7-9}

Para a obtenção de material de lesões bucofaríngeas, a biópsia continua sendo o procedimento mais usado pelos pesquisadores, pois, além de ser um material que permite estudo morfológico mais detalhado, possibilita a recuperação das células da camada basal onde o HPV poderia estar presente na forma latente.^{3,10} Entretanto, trata-se de um método relativamente caro, já que depende da presença de um médico e de aparatos cirúrgicos, que nem sempre estão disponíveis na unidade de atendimento.

Este trabalho teve por objetivo verificar, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase e hibridização reversa em linhas, a concordância do achado do HPV em material colhido por escovado e por biópsia de lesões de boca

e de orofaringe, testando a viabilidade do método do escovado para a colheita de material de lesão de boca e de orofaringe.

Método

Estudo prospectivo em corte transversal de 35 voluntários com lesão de boca ou de orofaringe que tivesse indicação de biópsia, atendidos consecutivamente num ambulatório de otorrinolaringologia de um hospital geral, no período de abril a dezembro de 2012, que preenchessem os critérios de inclusão (indivíduos com mais de 21 anos de idade, com lesão branca ou vermelha, vegetante, infiltrativa e/ou ulcerada de cavidade bucal ou orofaríngea com mais de 15 dias de duração) e de exclusão (contra-indicação clínica para o procedimento cirúrgico e uso de antivirais). Foram comparados os resultados da pesquisa do HPV no material obtido por escovado e por biópsia de uma mesma lesão.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, cadastrado sob o nº 192/09. Os pacientes selecionados assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário sobre dados epidemiológicos, antes de serem submetidos à colheita do material, como idade, gênero, consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas, total de parceiros sexuais durante toda a vida e nos últimos seis meses, tipo de parceiro, tempo de lesão e localização.

A colheita das amostras biológicas foi realizada por um mesmo profissional, em ambiente cirúrgico, com técnicas de assepsia e anestesia infiltrativa locorregional com lidocaína a 1%. A colheita do material se iniciava pelo escovado, esfregando-se na lesão uma escova Cytobrush® Plus em três movimentos para frente e para trás, seguida pela biópsia com lâmina de bisturi, evitando-se as áreas de necrose e, quando possível, era incluído tecido adjacente à lesão.

A escova com o material era conservada em um criotubo contendo solução salina aquosa a 0,9%, que foi imediatamente congelado em tambor com nitrogênio líquido a menos 170 °C. Em seguida foi procedida a biópsia, e o material dividido em três fragmentos: o primeiro foi colocado em solução aquosa tamponada de formaldeído a 10%, para estudo anatomopatológico; o segundo foi destinado a esta pesquisa; e o terceiro ao Biobanco. Os fragmentos eram acondicionados em criotubos distintos e secos, sendo prontamente congelados no mesmo tambor. Todas as amostras foram transportadas juntas até o freezer, permanecendo congeladas a menos de 80 °C, até serem processadas pelo Laboratório de Biologia Molecular.

As amostras foram processadas de acordo com as normas de biossegurança vigentes. Para a extração do DNA utilizou-se método *in house*, onde a amostra foi digerida com proteinase -K, seguida por uma purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 Invitrogen) e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop1000 (*Thermo scientific*).

A qualidade do DNA obtido foi assegurada realizando-se a PCR de β -globina humana com os iniciadores PC03/PC04 com aplicon de 110 pb (Saiki et al., 1995). Tanto as amostras positivas como negativas para β -globina humana foram genotipadas utilizando-se o *kit* de hibridização *Linear Array* (*Roche Diagnostics*), que permite a identificação de 37 tipos de HPV de alto e baixo riscos através da hibridização reversa em linhas.

O estudo estatístico deste trabalho foi descritivo, com o auxílio de medidas de localização e com resultados apresentados em uma tabela. Para variáveis quantitativas, foi utilizado o teste “z”. A hipótese nula (H_0) foi não haver diferença significativa entre as duas proporções, para um nível de significância de 0,05. O programa XLSTAT 2013.4.02 foi usado para testar as duas proporções, com avaliação unilateral à direita, em um intervalo de confiança de 95% para a diferença entre as proporções.

O levantamento bibliográfico foi realizado na internet, usando as bases de dados da *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (PubMed) e da Biblioteca Virtual em Saúde (Lilacs), sendo usados os seguintes descritores de assunto: *polymerase chain reaction, human papillomavirus, oral mucosa, oropharyngeal mucosa, oropharynx, detection, brushing e biopsy*.

Resultado

Foram estudados 35 indivíduos, sendo 26 homens e nove mulheres, numa relação aproximada de 3:1 de homens e mulheres. A idade variou de 37 a 77 anos, com média de 54 anos. Todos se autodeclararam heterossexuais. Com relação aos hábitos sociais, 11 (31,4%) nunca haviam consumido bebidas alcoólicas regularmente, 18 (51,4%) não consumiam mais e 6 (17,1%) ainda mantinham o hábito; 4 (11,4%) nunca haviam fumado, 11 (31,4%) eram ex-tabagistas e 20 (57,1%) eram tabagistas.

Em 21 (60%) das 35 lesões foi identificado o CEC (21/35), e destes, 15 (71,4%) eram moderadamente diferenciados (15/21), 3 (14,3%) bem diferenciados (3/21) e 3 (14,3%) pouco diferenciados (3/21). Das demais (14/35), em 5 (35,7%) foi feito o diagnóstico anatomopatológico de papilomatose; em 3 (21,4%) de papilomas escamosos; em 3 (21,4%) de processos inflamatórios crônicos ulcerados; em 2 (14,3%) de linfomas; e 1 (7,2%) de pólipos fibroepiteliais.

Quanto à localização, 10 (28,6%) eram de língua, sendo 6 da base; 9 (25,7%) de tonsila palatina; 7 (20%) de palato mole; 3 (8,6%) de mucosa da bochecha; 2 de assoalho bucal (5,7%) e 1 (2,9%) nas seguintes localizações: pilar anterior, úvula, lábio inferior e mucosa de orofaringe.

Todas as amostras obtidas por biópsia tiveram 100% de positividade para a β -globina; em contrapartida, nas amostras por escovados a positividade foi de 54,3% (19/35). Foram comparados os 19 pares, sendo que em 18 houve concordância nos achados pela presença ou não de DNA do HPV. Nas amostras por biópsia houve positividade para o DNA do HPV em três lesões, o HPV-16 em um mesmo paciente do escovado, além do HPV-6 em um paciente com linfoma de base de língua e o HPV-11 em um papiloma de orofaringe, e no escovado, o DNA do HPV foi isolado pelo escovado em dois casos de CEC moderadamente diferenciado de tonsila palatina (tabela 1).

Análise estatística

Das 35 amostras pelo escovado, apenas 19 foram analisadas - aquelas que eram positivas na reação de β -globina - e, dentre elas, duas eram positivas para o HPV (2/19), com uma proporção de 0,105263. Já as amostras de tecido obtiveram 100% de positividade para a β -globina, sendo três positivas para o HPV, com uma proporção de 0,085714. Em apenas um

Tabela 1 Características das amostras e resultados obtidos pela PCR do gene β -globina, detecção do DNA viral, genotipagem pela hibridização em linha do material obtido por escovado e por biópsia

Caso	Características das lesões	Amostras de escovado		Amostra de tecido	
		β -globina	DNA HPV	β -globina	DNA HPV
1	CEC de língua	Sim	Não	Sim	Não
2	CEC de tonsila palatina	Sim	Não	Sim	Não
3	CEC de mucosa bucal	Sim	Não	Sim	Não
4	CEC de tonsila palatina	Sim	HPV-52	Sim	Não
5	Processo inflamatório ulcerado de tonsila palatina	Sim	Não	Sim	Não
6	Papilomatose de mucosa jugal	Sim	Não	Sim	Não
7	CEC de base de língua	Sim	Não	Sim	Não
8	Processo inflamatório ulcerado de soalho bucal	Não	Não	Sim	Não
9	Linfoma de Hodgkin de base de língua	Não	Não	Sim	HPV-6
10	CEC de tonsila palatina	Não	Não	Sim	Não
11	Papilomatose de palato mole	Não	Não	Sim	Não
12	Papilomatose de palato mole	Não	Não	Sim	Não
13	CEC de soalho de boca	Não	Não	Sim	Não
14	CEC de lábio inferior	Não	Não	Sim	Não
15	CEC de base de língua	Não	Não	Sim	Não
16	Processo inflamatório ulcerado de mucosa jugal	Não	Não	Sim	Não
17	CEC de língua	Sim	Não	Sim	Não
18	Papilomatose de palato mole	Não	Não	Sim	Não
19	Papilomatose de tonsila palatina	Não	Não	Sim	Não
20	CEC de base de língua	Não	Não	Sim	Não
21	Papiloma escamoso de orofaringe	Não	Não	Sim	HPV-11
22	Linfoma não Hodgkin de tonsila palatina	Sim	Não	Sim	Não
23	CEC de palato mole	Sim	Não	Sim	Não
24	CEC de língua	Sim	Não	Sim	Não
25	CEC de tonsila palatina	Não	Não	Sim	Não
26	CEC de tonsila palatina	Sim	Não	Sim	Não
27	CEC de tonsila palatina	Sim	HPV-16	Sim	HPV-16
28	CEC de base de língua	Sim	Não	Sim	Não
29	Papiloma escamoso de língua	Não	Não	Sim	Não
30	Pólipo fibroepitelial de palato mole	Sim	Não	Sim	Não
31	Papiloma escamoso de pilar anterior	Sim	Não	Sim	Não
32	CEC de úvula	Sim	Não	Sim	Não
33	CEC de palato mole	Sim	Não	Sim	Não
34	CEC de língua	Sim	Não	Sim	Não
35	CEC de palato mole	Não	Não	Sim	Não

CEC, carcinoma espinocelular; DNA-ácido, desoxirribonucleico; HPV, papilomavírus humano.

par de amostras positivas houve concordância com a genotipagem do correspondente escovado. O programa XLSTAT 2013.4.02 foi usado para testar as duas proporções. No teste z para as duas proporções, foi feita a avaliação unilateral à direita, com um intervalo de confiança de 95%. A diferença

entre as proporções foi de 0,020, o z (valor observado) foi de 0,230, com z (valor crítico) de 1,645 e p-valor (unilateral) de 0,409, concluindo, assim, que não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de HPV nos dois tipos de amostras.

Discussão

Tumores de cabeça e pescoço possuem uma incidência mundial de 460.000 novos casos por ano, levando a 228.000 óbitos, estimativa de 2014 do Instituto Nacional do Câncer do Brasil. O HPV-16 é responsável por 25% de todos os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, sendo que a sua presença é observada em 45 a 90% dos casos de tumores de orofaringe e em torno de 24% de tumores de laringe e cavidade oral.³

Para este trabalho, o número de casos foi estabelecido com base na literatura, onde a prevalência do HPV em lesão de boca e de faringe é de aproximadamente 36% ($p = 0,36$), sendo estimado um erro de 3% para definir o tamanho da amostra necessária para a análise.¹¹⁻¹⁷

No Brasil, em indivíduos sem lesão com pequenas amostras (até 100 indivíduos), a prevalência do HPV variou de 0 a 12%,¹⁸⁻²¹ enquanto em outros países a prevalência variou de 0²² a 97%,²³ fazendo supor que a prevalência da infecção oral e orofaríngea pelo HPV na população brasileira seja baixa; porém, faz-se necessário um estudo de rastreamento populacional para um melhor conhecimento da prevalência real do HPV em cavidade bucofaríngea da população brasileira. Nesta pesquisa foram encontrados os HPV de alto risco (HPV-16 e HPV-52) e os de baixo risco (HPV-6 e HPV-11), com uma prevalência total de 11,4%. A prevalência do HPV em lesões bucais e orofaríngeas é muito variada, de 0²⁴ a 77,8%,⁹ e nos trabalhos nacionais oscilou de 0⁷ a 75%,¹⁹ não sendo possível comparar os resultados de forma consistente, pois os estudos variam muito na metodologia.

A prevalência do HPV é maior em pacientes que tiveram outras doenças sexualmente transmissíveis,²⁵ sendo o grande número de parceiros de sexo oral um fator preditivo para a detecção do HPV oral.²³ Entretanto, contrariando o explicitado, os indivíduos deste estudo que tiveram mais de 20 parceiros sexuais não tiveram DNA do HPV detectado em suas lesões.

Até o momento, não há um consenso sobre a melhor técnica de colheita em pacientes com lesão oral e na orofaringe, sendo necessário o investimento em novos trabalhos, por isso a comparação entre os métodos é importante.

No presente trabalho, quando foram comparados os métodos do escovado e da biópsia, nas amostras com CEC de boca ou de orofaringe, não houve diferença estatística entre os métodos, com concordância nos pares de amostras 94,7% (18/19). Termine et al. (2012), em um estudo semelhante, porém sem lesões de orofaringe, apontaram que a frequência de detecção pelo escovado e pela biópsia também não teve diferença estaticamente significativa, mas o método de biópsia demonstrou ser mais acurado na detecção do HPV de alto risco.²⁶

Lawton et al. (1992) analisaram três métodos de colheita e puderam concluir que o bochecho, quando usado isoladamente, é o melhor método; porém, a positividade pode ser aumentada quando associada a outros métodos de obtenção de material.²⁷ Jarboe et al. (2011) avaliaram a efetividade da captura híbrida em amostras de escovado oral e de enxague bucal, encontrando maior detecção nas amostras de escovado que nas de enxague bucal.²⁸ Read et al. (2012) compararam três métodos, sendo o enxague bucal o que teve maior sensibilidade de detecção, principalmente naqueles que haviam escovado os dentes antes do enxague.²³

Mesmo que a colheita do escovado tenha sido feita de forma padronizada, seguindo protocolos previamente estabelecidos, 45,7% (16/35) estavam inadequadas para a pesquisa do HPV, sugerindo uma baixa sensibilidade do método de colheita, ou por uma incapacidade da escova destinada à colheita ginecológica em obter material das lesões de boca e de orofaringe, ou porque o meio em que foram colocadas não foi capaz de preservá-las. Talvez a escolha de soluções de fixação e de preservação da amostra na escova, como a solução PreservCyt®,² a solução de Digene®²⁹ e a solução salina tamponada com fosfato (PBS),^{2,15,26,29-31} possa deixar as amostras em melhores condições para exame citológico do que aquelas que foram acondicionadas em solução salina, como foi utilizado nessa pesquisa. A comparação entre as soluções de fixação do material de boca e de orofaringe na escova poderia esclarecer esta dúvida.

Os resultados desta pesquisa apontam para a participação do HPV em lesões de cavidade oral e orofaríngea, porém, são necessários mais estudos para detalhamento do método de colheita, com investimento em kits específicos para detecção de células escassas, o que permitirá um maior rastreamento do HPV nessas lesões orais e orofaríngeas relacionadas com o HPV, com melhora na prevenção e no tratamento.

Conclusões

Não houve diferença estatística entre os métodos do escovado e da biópsia para detecção do DNA viral nas lesões de boca e de orofaringe, mas o grande número de amostras inadequadas obtidas por escovado sugere haver uma fragilidade desse método na obtenção de amostras deste tipo lesão.

Financiamento

Este estudo foi financiado pelo FAPESP.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Prof.^a Dr.^a Luísa Lina Villa e Sra. Maria Cecília Costa.

Referências

1. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37: 401-18.
2. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res.* 2008;39: 189-97.
3. D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med.* 2011;53 Suppl. 1:S5-11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmed.2011.08.001>.

4. Upile T, Jerjes W, Al-khawalde M, Radhi H, Sudhoff H. Oralsex, cancer and death: sexually transmitted cancers. *Head Neck Oncol.* 2012;6:31.
5. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12:418-24.
6. Yeudal WA. Human papillomaviruses and oral neoplasia. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992;28B:61-6.
7. Rivero ERC, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res.* 2006;20:21-4.
8. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S:543-51.
9. Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storhz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:101-8.
10. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008;19:1681-90.
11. Giovannelli L, Campisi G, Colella G, Capra G, Liberto CD, Caleca MP, et al. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther.* 2006;10:49-55.
12. Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Souza LB, Medeiros SRB, Costa ALL. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx.* 2009;36:450-6.
13. SahebJamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashi Moghadam F, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal.* 2009;14:e525-8.
14. Duray A, Descamps G, Bettonville M, Sirlaine N, Ernoux-Neufcoeur P, Guenin S, et al. High prevalence of high-risk human papillomavirus in palatine tonsils from healthy children and adults. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;145:230-5.
15. Fakhry C, Rosenthal BT, Clark DP, Gillison M. Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal Pap-test equivalent in high-risk populations. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4:1378-84.
16. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 immunohistochemistry, consensus PCR HPV-DNA, and *in situ* hybridization. *Infect Agent Cancer.* 2012;7:4, <http://dx.doi.org/10.1186/1750-9378-7-4>.
17. Geibler C, Tahtali A, Diensthuber M, Gassner D, Stover T, Wagenblast J. The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCHN – a retrospective single-center study. *Anticancer Res.* 2013;33:913-6.
18. Ribeiro KMX, Alvez JM, Pignatari SSN, Weckx LLM. Detection of human papillomavirus in the tonsils of children undergoing tonsillectomy. *Braz J Infect Dis.* 2006;10:165-8.
19. Xavier SD, Bussoloti Filho I, Carvalho JM, Framil VMS, Castro TMPPG. Frequência de aparecimento de papilomavirus humano (HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. *Intl Arch Otorhinolaryngol.* 2007;11:36-44.
20. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho MGC, Barros FS. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos saudáveis por meio da PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76:78-84.
21. Pinheiro RS, França TRT, Ferreira DC, Ribeiro CMB, Leão JC, Castro GFB. Human papillomavirus in the oral cavity of children. *J Oral Pathol Med.* 2011;40:121-6.
22. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Robinson LJ, Wilson T. Prevalence of oncogenic human papillomavirus 16 e 18 in the palatine tonsils of the general adult population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;135:534-7.
23. Read TRH, Hocking JS, Vodstrcil LA, Tabrizi SN, McCullough MJ, Grulich AE, et al. Oral human papillomavirus in men having sex with men: risk-factors and sampling. *PLoS ONE.* 2012;7:e49324, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049324>.
24. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavaldá C, Poveda R, Scully C, et al. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:46-9.
25. Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck.* 2011;33:847-55.
26. Termine N, Giovannelli L, Rodolico V, Matranga D, Pannone G, Campisi G, et al. Brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2012;48:870-5.
27. Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:265-9.
28. Jarboe EA, Willis M, Bentz B, Buchmann L, Hunt J, Ellis G, et al. Detection of human papillomavirus using hybrid capture 2 in oral brushing from patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011;135:766-9.
29. Vidal AKL, Caldas Júnior AF, Mello RJV, Brandão VRA, Rocha GI, Taromaru. HPV detection in oral carcinomas. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40:21-6.
30. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1408-10.
31. Richter KL, van Rensburg EJ, van Heerden WFP, Boy SC. Human papillomavirus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South Africa women prior to antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:555-9.