

# Detecção de HPV em lesões orais através da Técnica de Hibridização in Situ

## *HPV detection in oral lesions by in Situ Hybridization*

Marta Rabello Piva<sup>I</sup>  
Paulo Ricardo Saquete Martins Filho<sup>II</sup>  
Thiago de Santana Santos<sup>III</sup>  
Isabela Vieira Simões<sup>III</sup>  
Tatiana de Oliveira Carvalho<sup>III</sup>

Recebido em 02/04/2008  
Aprovado em 17/07/2008

### RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar, através da técnica de Hibridização in Situ para HPV, lesões orais que apresentaram o fenômeno citopático da coilocitose em análise histológica, sob microscopia de luz. Foram analisados 07 fibromas, 02 displasias, 01 carcinoma verrucoso e 06 carcinomas epidermóides, com coilocitose, foram avaliados quanto à presença de HPV através da Hibridização in Situ (método Estreptoavidina - Biotina) com sondas de amplo espectro e sondas específicas para os tipos 6/11 e 16/18. Dentre os resultados, obtivemos que a marcação para HPV amplo espectro apresentou positividade em todos os casos de fibroma, displasia oral e carcinoma epidermóide, não havendo, no entanto, marcação no caso de carcinoma verrucoso. Para as sondas específicas, 75% das lesões estudadas apresentaram co-infecção. Pôde-se concluir que esse estudo confirma a relação entre coilocitose e presença do HPV nas lesões avaliadas, sugere que os tipos HPV 6/11 e 16/18 são fatores de risco para a carcinogênese oral e conclui que qualquer uma das lesões estudadas pode estar associada a esse vírus.

**Descritores:** Sondas DNA, HPV, Hibridização in Situ, neoplasias bucais.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze oral lesions that presented koilocytosis on morphological analysis by the procedure of in situ hybridization. Seven fibromas, 2 dysplasias, 1 verrucous carcinoma and 6 spindle cell carcinomas with koilocytosis were evaluated for their positivity for the human papillomavirus types 6/11 and 16/18, by means of an in Situ Hybridization analysis (Streptoavidin – Biotin complex) with wide-spectrum probes and specific probes for these types. The marking for wide-spectrum HPV was positive in all cases of fibroma, oral dysplasias and spindle cell carcinomas, but was negative in verrucous carcinoma. In addition, 75% of the cases showed co-infection (HPV 6/11 and 16/18). It was concluded that this study confirms the correlation between koilocytosis and the presence of the human papilloma virus in the lesions evaluated, suggests that the HPV types 6/11 and 16/18 are risk factors for oral carcinogenesis and concludes that any one of the lesions studied may be associated with that virus.

**Keywords:** DNA Probes, HPV, in Situ Hybridization, mouth neoplasms.

<sup>I</sup> Mestre e Doutoranda em Patologia Bucal pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Professora das disciplinas Patologia Bucal e Diagnóstico Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

<sup>II</sup> Mestrando em Ciências da Saúde e Especializando em Microbiologia pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Professor substituto das disciplinas Patologia Bucal e Diagnóstico Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

<sup>III</sup> Cirurgiões-Dentistas graduados pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Ex-bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) - CNPq/UFS.

## INTRODUÇÃO

Os agentes biológicos são fatores importantes em infecções locais ou em diferentes tipos de lesões da mucosa bucal. Dentre esses agentes, os vírus merecem maior importância devido a sua capacidade em desencadear muitos tipos de doenças, sua complexidade e dificuldade de acesso terapêutico<sup>1</sup>.

Desde meados de 1911, quando Peyton Rous demonstrou que os vírus induziam tumores em galinhas, esses microrganismos têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de 1/5 de todos os tumores em humanos, apesar de os mecanismos ainda serem obscuros<sup>2</sup>.

Segundo Kisseljov<sup>3</sup>, aproximadamente 15% dos cânceres na população mundial podem ser ligados etiologicamente a infecções virais, sendo o Papilomavírus Humano (HPV) um dos responsáveis por essa incidência, principalmente devido a sua forte associação com o câncer cervical uterino. Como consequência, há um aumento progressivo do interesse da comunidade científica em aperfeiçoar os métodos de diagnóstico, técnicas de tratamento e profilaxia das infecções por HPV.

O Papilomavírus Humano é um vírus DNA circular de fita dupla, sem envelope, com capsídeo icosaédrico, pertencente à família Papovaviridae e que replica no núcleo das células epiteliais da pele, mucosa anogenital e orofaríngea. Na mucosa bucal, está fortemente relacionado ao desenvolvimento de lesões benignas (verruga vulgar, papiloma escamoso, condiloma acuminado e hiperplasia epitelial focal), potencialmente malignas (leucoplasia e eritroplasia) e malignas (carcinoma verrucoso e carcinoma epidermóide)<sup>4</sup>.

A infecção pelo HPV se instala em decorrência da abrasão ou microlesões da pele e mucosa com conseqüente inoculação do vírus nas células indiferenciadas da camada basal do epitélio. No núcleo da célula hospedeira, o DNA viral pode assumir duas formas físicas: (1) Epissomal, em que não há integração entre DNA viral e DNA hospedeiro, sen-

do comumente relacionada às infecções latentes, subclínicas, ou até mesmo, no desenvolvimento de lesões benignas; (2) Integrada, em que há integração estável entre DNA viral e DNA hospedeiro, alterando a expressão de alguns genes virais e provocando um processo de imortalização celular<sup>5-7</sup>.

Segundo Neville e Day<sup>8</sup>, o desenvolvimento de lesões após exposição da mucosa ao vírus está intimamente ligado às condições do hospedeiro e à presença de fatores de risco, como o álcool e o fumo.

No que se refere à genotipagem, dos mais de 100 tipos de HPV descobertos, um destaque maior tem sido dado aos tipos de baixo potencial oncogênico (HPV-6 e 11), risco intermediário (HPV-31, 33 e 35) e de alto potencial oncogênico (HPV-16 e 18)<sup>9</sup>.

zur Hausen<sup>4</sup> afirma que 20% dos cânceres de orofaringe contêm DNA dos mesmos tipos de HPV encontrados em cânceres do trato ano-genital, sendo representados, principalmente pelos tipos 16,18,31,33,39,45,52,58 e 69.

Bouda et al.<sup>10</sup> investigaram a presença de HPV através da técnica de PCR, em 19 casos de carcinoma de células escamosas localizados na cavidade oral e observaram que 18 amostras estavam infectadas pelo vírus, sendo 13 pelo HPV-16.

Soares et al.<sup>11</sup> investigaram a presença de HPV-6/11 e 16/18 através do método de Hibridização in Situ, em 30 casos de lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasia e detectaram que 20% das biópsias com displasia severa foram positivas para o HPV-16/18.

Umudum et al.<sup>12</sup> afirmaram que o HPV não está somente envolvido na iniciação de processos tumorais mas também tem um importante papel no desenvolvimento de metástases.

Martinez et al.<sup>13</sup> demonstraram alterações específicas na expressão gênica celular em carcinomas epidermóides orais positivos para HPV. Os autores identificaram alguns genes envolvidos na estrutura nuclear e na meiose (SYCP2), diferenciação celular (CRABP2), reparo do DNA (RFC5), regulação da

transcrição (ZNF238) e desenvolvimento da epiderme (KLK8). Assim, esses genes poderiam ser usados como biomarcadores para o desenvolvimento de CEO associados ao HPV.

O diagnóstico de infecção por HPV é frequentemente baseado na combinação das características clínicas e histopatológicas dos tecidos submetidos à biópsia. Alguns dos aspectos citomorfológicos, como a coilocitose, sugerem infecção por HPV, mas não confirmam sua presença ou o tipo de HPV presente. A coilocitose pode ser definida como a presença de células epiteliais, exibindo núcleos picnóticos, irregulares e hiper cromáticos, com halo claro perinuclear extenso<sup>14</sup>. É com base nesta alteração que os tecidos supostamente infectados pelo vírus podem ser selecionados para posterior comprovação e tipificação.

Xavier, Bussoloti Filho e Lancellotti<sup>15</sup> verificaram que 75% dos casos de carcinoma epidermóide oral estudados sobre microscopia de luz foram positivos para coilocitose, sugerindo uma forte associação entre o vírus e o desenvolvimento desses tumores. São vários os métodos de biologia molecular utilizados atualmente para detecção do HPV, os quais podem ser classificados de acordo com sua sensibilidade. Assim, os de baixa sensibilidade (imunoperoxidase, imunofluorescência e Hibridação in Situ), que apenas detectam o vírus quando presentes em mais de 10 cópias de DNA viral por célula; os considerados de moderada sensibilidade (Southern blot, dot blot e hibridação dot reversa), por apenas detectarem o vírus quando da presença de 1 a 10 cópias do DNA e os de alta sensibilidade (PCR), por detectarem o vírus quando menos de 1 cópia viral estiver presente.

Desses métodos, um dos primeiros a serem utilizados foi o da Hibridação in Situ, que visa detectar o vírus através de frações de genoma. Partes do tecido supostamente infectado são tratadas com enzimas (proteases) que expõem o DNA alvo, desnaturando-o. Em contato com frações conhecidas de DNA do HPV, ocorrerá ou não a reação, indicando a presença ou ausência daquele determinado tipo de

HPV. Dentre as suas vantagens, estão a capacidade de ser realizada diretamente nos tecidos seccionados ou esfregaços citológicos e a facilidade da localização de um sinal de determinado microrganismo, permitindo a análise célula a célula. A Hibridação in Situ é uma das formas mais seguras de identificação da presença do HPV e tipificação em seções teciduais embebidas em parafina. Para tanto, são utilizados "kits" compostos por sondas que são, na maioria das vezes, consideradas seguras, confiáveis e práticas<sup>16-18</sup>.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estudar, através da técnica de Hibridação in Situ para HPV, algumas lesões orais que apresentaram o fenômeno da coilocitose em análise histológica, sob microscopia de luz.

## METODOLOGIA

Delineamento: a pesquisa, delineada como descritiva, observacional, prospectiva e de abordagem quantitativa, incluiu todos os pacientes que se submeteram à biópsia (incisional ou excisional) de mucosa bucal em decorrência da presença de lesão benigna, pré-maligna ou maligna e que tiveram, através do exame histológico convencional, utilizando a técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE), a presença de coilocitos no epitélio de revestimento. A coilocitose, sinal citomorfológico sugestivo de infecção por HPV, foi definida como uma célula dotada de núcleo picnótico, irregular e hiper cromado, circundado por um extenso halo perinuclear<sup>14</sup>. Os casos positivos para a presença de coilocitose e devidamente diagnosticados foram, então, selecionados para a realização da Hibridação in Situ.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Patologia e Citologia Ltda. e no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFS, em Aracaju-SE, no período de 1999 a 2003.

Foram excluídas as lesões sabidamente envolvidas com o papilomavírus humano, como a verruga vulgar, o papiloma escamoso, o condiloma

acuminado e a hiperplasia epitelial focal, pois o foco do trabalho foi de estudar casos classicamente não-envolvidos com o vírus e que apresentaram coilocitose em seu epitélio de revestimento.

**Método da Hibridização in Situ:** foram incluídos 16 blocos dos materiais em parafina e submetidos a cortes histológicos de 3 mm de espessura, sendo colocados em lâminas silanizadas à base de 3-aminopropil-trietoxissilano (SIGMA), e submetidos à reação de Hibridização in Situ, utilizando o método da Estreptoavidina - Biotina.

Primeiramente, foi realizada a desparafinação dos cortes, e estes foram submetidos a banhos em xilol, a 60°C durante 15 minutos e, posteriormente, à temperatura ambiente, por mais 15 minutos. Seguiu-se à hidratação em álcool absoluto e lavagem em água destilada. Em seguida, os cortes foram mergulhados em ácido cítrico fervente, sob pressão, durante 2 minutos e, posteriormente, receberam lavagem em água destilada 3x por 10 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizada água oxigenada 3%, em dois banhos de 5 minutos, seguida de lavagem com tampão PBS (1/1000, 500ml) e Tween 20 (0,5ml, ponta azul), durante 3 minutos.

As sondas de amplo espectro 6/11 e 16/18 foram colocadas sobre os cortes, aquecendo-se em placa a 95°C por 10 minutos. As lâminas foram resfriadas rapidamente e incubadas overnight, em câmara úmida a 37°C. Após a incubação, as lâminas sofreram lavagem estridente em diluição de 1/200 a 55°C durante 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Streptavidina Primary, em temperatura ambiente, durante 15 minutos, lavagem em tampão PBS, incubação com biotil-tiramida, lavagem em tampão PBS, incubação com Streptavidina - HRP Secondary, em temperatura ambiente, durante 15 minutos e lavagem em tampão PBS 2x, durante 5 minutos.

A revelação da reação de Hibridização in Situ foi realizada com diaminobenzidina, seguida de lavagem em água destilada. As lâminas foram, então, contracoradas com Hematoxilina de Mayer, durante 2

minutos, lavadas em água destilada, desidratadas em álcool e xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

Hibridização in Situ positiva foi considerada quando, aproximadamente, 25% das células apresentaram-se coradas com a biotina. Os padrões físicos do DNA viral foram definidos como (1) epissomal ou difuso, quando todo o núcleo tornou-se marrom e (2) integrado ou em ponto, quando foram visualizados um ou dois pontos marrons por núcleo hibridizado.

As reações de Hibridização in Situ foram acompanhadas de controle positivo, controle negativo e controle de reação.

**Questões Éticas:** a referente pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe em reunião realizada no dia 08/01/2003, sendo parte do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/UFS.

## RESULTADOS

Durante o período de seleção de casos, 16 lesões com coilocitose foram estudadas, incluindo 07 casos de fibroma, 02 de displasia (cl clinicamente diagnosticados como leucoplasia e eritroplasia), 01 de carcinoma verrucoso e 06 carcinomas epidermóides.

A reação de Hibridização in Situ para HPV de amplo espectro apresentou positividade em todos os casos de fibroma, displasia oral e carcinoma epidermóide, não havendo, no entanto, marcação no caso de carcinoma verrucoso. Dessa forma, 93,75% das lesões com coilocitose apresentaram positividade para a presença do vírus (Tabela 01).

**Tabela 01. Casos selecionados e sua positividade para HPV amplo espectro pela técnica da Hibridização in Situ.**

Casos	Nº de Casos com Coilocitose ao MO(Hematoxilina & Eosina)	Nº de Casos Positivos para HPV(Hibridização in situ)
Fibroma	07	07
Displasia	02	02
Carcinoma Verrucoso	01	-
Carcinoma Epidermóide	06	06
Total	16	15

Em relação à utilização de sondas específicas (6/11 e 16/18), dos 07 casos de fibroma estudados, 05 apresentaram positividade para ambas as sondas, ao passo que uma lesão sofreu marcação apenas para 6/11 e a outra para 16/18. Os 02 casos de displasia foram positivos para as duas sondas específicas. Para os casos de carcinoma epidermóide, houve co-infecção em 05 casos. Em apenas uma situação, não houve marcação nem para HPV 6/11 nem para HPV 16/18. Assim, do total de casos estudados, 12 (75%) apresentaram co-infecção, ou seja, marcação positiva para as duas sondas específicas utilizadas (Tabela 02).

**Tabela 02. Resultado da Hibridização in Situ para sondas específicas.**

Casos	(+) HPV 6/11	(+) HPV 16/18	Co-Infecção
Fibroma	06	06	05
Displasia	02	02	02
Carcinoma Verrucoso	-	-	-
Carcinoma Epidermóide	05	05	05
Total	13	13	12

Em relação ao genoma viral, para todas as lesões que apresentaram marcação específica para os tipos de HPV estudados, houve a presença das duas formas físicas do vírus, ou seja, a integrada e a episomal.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho revelou forte correlação entre a presença de coilocitose e a positividade para HPV através da hibridização in situ. Das 16 lesões estudadas, apenas uma não se mostrou positiva para o vírus, talvez pelo baixo número de cópias de HPV presentes na lesão. Assim, uma das hipóteses que poderia ser levantada através deste estudo é a de que a coilocitose poderia ser considerada característica patognomônica para a presença do vírus e que métodos de biologia molecular poderiam, assim, serem utilizados para a tipificação do HPV.

Dos fibromas avaliados, 71,4% foram positivos para as duas sondas de tipificação utilizadas. Na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho

que apresentasse resultado semelhante ao desse estudo<sup>19,20</sup>, talvez por ser essa uma lesão muito pouco relacionada à etiologia viral e, em especial, pela descrença dos autores em sugerir a probabilidade de um processo viral em uma lesão benigna, corriqueira e de etiologia presumivelmente conhecida. Porém, diante dos achados, pode-se levantar a hipótese de que o processo traumático, a causa maior dessa entidade, somado à infecção pelo HPV, pode ter papel oncogênico importante, devendo ser esse mais um ponto a ser investigado nos futuros estudos sobre a atuação desse vírus na cavidade oral.

Nas lesões diagnosticadas como displasias orais (uma leucoplasia e uma eritroplasia), houve 100% de marcação com predomínio total da co-infecção. Esse dado confirma a afirmação de Costa et al<sup>1</sup>, de que não são apenas as lesões proliferativas que possuem etiologia pelo HPV e que pode haver associação desse vírus com lesões ainda não comprovadas, como a eritroplasia.

Segundo Eversole<sup>21</sup>, as lesões proliferativas, geralmente de aspecto verrucoso, encontradas em muitas partes do corpo, são as entidades morfológicas mais corriqueiramente associadas à presença do HPV. Apesar de concordarmos com tal informação, o único caso de carcinoma verrucoso estudado em nossa amostra foi negativo para os tipos de HPV estudados, o que não impede que, em análise futura, utilizando-se de métodos mais sensíveis, como a PCR, ele se mostre positivo para este microrganismo.

Nosso estudo teve um papel importante no entendimento das variações dos resultados encontrados na literatura a respeito da participação do HPV na etiologia do carcinoma epidermóide oral. Isto se deve ao fato de a nossa amostra ter-se baseado na presença da coilocitose, obtendo-se um resultado positivo para 100% dos casos, apesar de sabermos que apenas uma percentagem de todos os carcinomas epidermóides orais é provocada pelo vírus.

A presença do HPV nas lesões malignas leva a concordar com alguns autores<sup>4, 6, 10, 11-13, 15, 22</sup>, que

afirmam ser esse vírus um agente carcinógeno e defendem a hipótese de uma interação sinérgica dessa virose com outros agentes facilitadores do processo oncogênico, como o fumo e os fatores traumáticos.

Em relação ao estado físico do genoma viral, sabe-se que, de uma maneira geral, a forma episomal está associada a infecções produtivas, levando ao desenvolvimento de lesões benignas da mucosa bucal. Entretanto, embora se considere que a possibilidade de transformação celular evolutiva para o câncer ocorra na forma integrada, em algumas situações (especialmente associadas ao HPV-16), pode haver essa transformação na forma episomal<sup>23</sup>. Em nosso estudo, a forma episomal também foi encontrada nos casos de displasias e carcinomas epidermóides, juntamente com a forma integrada, levando-nos a especular sobre um possível papel da forma episomal no desenvolvimento dessas lesões.

De maneira semelhante, a forma integrada também pôde ser vista em lesões benignas da mucosa bucal, embora não se possa afirmar quais as conseqüências, em longo prazo, que esta forma viral possa trazer em termos de transformação maligna do epitélio de revestimento dessas lesões.

Um dos grandes motivos pelos quais é grande a incidência de HPV em lesões que envolvem o epitélio oral se deve ao traumatismo constante a que essa estrutura é submetida. É claro que, em muitas dessas lesões, o vírus encontra-se em estado de latência e, em outras, é o responsável pelo desenvolvimento da lesão. O vírus ativado, como já foi citado, pode desenvolver papilomas, verrugas, condilomas e hiperplasias epiteliais focais, entidades comprovadamente causadas por HPV, porém de tipos diferentes e com características clínicas e histológicas bem definidas. Independente da existência ou não da relação viral com a lesão, ou seja, ativo ou estado de latência, o tipo de HPV infectante é o que deve preocupar. Caso o vírus tenha papel oncogênico, a qualquer momento, por um estímulo ou pela queda da imunidade do indivíduo, pode ocorrer o desen-

volvimento de lesões pré-malignas e/ou malignas na cavidade oral. Assim, o ponto principal acerca da relação do HPV com a carcinogênese oral é o modo pelo qual o vírus atua, se de forma oportunista, isolada ou sinérgicamente, sendo aceito apenas o fato de que é impossível não haver associação alguma entre ele, o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral, visto que a mucosa, nessa região, é semelhante à cervical, e aí o poder do vírus sobre a gênese de entidades malignas já é comprovado.

## CONCLUSÕES

- Existe uma correlação entre coilocitose e a presença de HPV nos tecidos.
- Qualquer uma das lesões estudadas pode estar associada ao HPV.
- Os tipos de HPV estudados são fatores de risco para a carcinogênese oral.
- A Hibridização in Situ pode ser considerada um método eficaz tanto para identificação quanto para tipificação do HPV.
- A detecção do HPV nas lesões orais é de fundamental importância para a prevenção do câncer de boca.

## REFERÊNCIAS

1. Costa LJ, Silveira FR, Batista JM, Birman EG. Human papillomavirus - its association with epithelial proliferative lesions. *Braz Dent J.* 1994;5(1):5-10.
2. Oliveira BV, Oliveira MBM. Vírus e câncer: comportamento da célula transformada. In: Tommasi AF, Garrafa V. Câncer bucal. São Paulo: Medisa; 1980. p.159-71.
3. Kisseljov FV. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. (Review). *Biochemistry (Mosc).* 2000; 65(1): 68-77.
4. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer:

- evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9): 690-8.
5. Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, et al. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immun.* 2001; 167: 497-504.
6. Fehermann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogenes.* 2003; 22: 5201-7.
7. Shai A, Brake T, SOmoza C, Lambert PF. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res.* 2007; 67(4): 1626-35.
8. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(4): 195-215.
9. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol.* 1989; 63(11): 4898-903.
10. 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.
11. Soares CP. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. *Rev Soc Bras Med Tropical.* 2002; 35(5): 439-44.
12. Umudum H, Rezanko T, Dag F, Dogruluk T. Human papillomavirus genome detection by in situ hybridization in fine-needle aspirates of metastatic lesions from head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer (Cancer Cytopathol).* 2005; 105: 171-7.
13. Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer.* 2007; 43(2): 415-32.
14. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. *Ann N Y Acad Sci.* 1956; 63: 1245-61.
15. Xavier SD, Bussoloti Filho I, Lancellotti CLP. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(4): 510-4.
16. Syrjänen SM. Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infections. *APMIS.* 1990; 98(2): 95-110.
17. Bagarelli LB, Oliani AH. Tipagem e estado físico de papilomavirus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. *RBGO.* 2004; 26(1): 59-64.
18. Carmo EFS, Fiorini A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. *Rev Saude Biol.* 2007; 2(1): 29-31.
19. Syrjänen KJ, Happonen RP, Syrjänen SM, Caloni B. Human papillomavirus (HPV) antigens and local immunologic reactivity in oral squamous cell tumors and hyperplasias. *Scand Dent Res.* 1984; 92(4): 358-70.
20. Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Happonen RP, Lamberg MA. In situ hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosal lesions. *Arch Dermat Res.* 1987; 279(8).

21. Eversole LR. Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses. J Calif Dent Assoc. 2000; 28(12): 922-7.

22. Vidal AKL, Caldas Júnior AF, Mello RJV; Brandão VRA, Rocha GI; Taromaru E. HPV detection in oral carcinomas. J Bras Patol Med Lab. 2004; 40(1): 21-6.

23. Eleutério Júnior J, Giraldo PC, Gonçalves AK. Marcadores imunoistoquímicos de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16INK4A. J Bras Doenças Sex Transm. 2006; 18(1): 62-5.

#### **ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA**

Thiago de Santana Santos

Rua Dr. Geraldo de Andrade, 101/801.

Bairro: Espinheiro CEP: 52021-220

Recife – Pernambuco

Fone: (81)32428595 / E-mail: thiago\_ctbmf@terra.com.br / saqmartins@hotmail.com