

Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR

Estudo epidemiológico do HPV na mucosa oral por meio de PCR

Willys Tristão¹, Rodrigo Metzker Pereira Ribeiro¹, Camila Andrea de Oliveira², Julio Cesar Betiol³,
Jussara de Sousa Ribeiro Bettini⁴

Keywords:

mouth mucosa,
papillomavirus
infections,
polymerase chain
reaction.

Abstract

The Human Papillomavirus (HPV) belongs to the *Papillomaviridae* family and has a capsid and a single DNA strand. Its infection occurs mainly through sexual intercourse, having an important tropism for skin and mucosal cells. **Aim:** To evaluate the HPV presence in normal oral mucosa of asymptomatic subjects and; in parallel, to correlate social behavioral habits with the virus. **Materials and Methods:** Contemporary cohort cross-sectional study. The HPV was found by PCR, using general primers MY09/11 in 125 oral mucosa samples submitted to DNA extraction and PCR to search for the beta-globin gene in order to assess the quality of the extracted DNA. In parallel, we carried out a study of behavioral issues associated with the patients. **Results:** All the samples had a positive diagnosis of the beta-hemoglobin gene. HPV was diagnosed in 23.2% of the samples analyzed. **Conclusion:** The virus was present in 29 of the 125 patients, without them having any clinical-pathological manifestation associated with the HPV. As to the social behavior of the patients, we concluded that oral sex is statistically correlated to the virus, and besides the HPV has been statistically more present in female patients.

Palavras-chave:

infecções por
papillomavirus,
mucosa bucal,
reação em cadeia
da polimerase.

Resumo

Pertencente à família *Papillomaviridae*, o papilomavírus humano (HPV) é formado por um capsídeo e uma única fita dupla de DNA. Sua infecção ocorre principalmente por forma sexual, apresentando grande tropismo por células cutâneas e mucosas. **Objetivo:** Avaliar a presença do HPV em mucosa oral de pacientes assintomáticos e em paralelo correlacionar os hábitos sociais comportamentais com a presença viral. **Material e Método:** Estudo de coorte contemporânea com corte transversal. O diagnóstico da presença viral foi realizado por PCR, utilizando os primers gerais MY09/11 em 125 amostras de mucosa oral, submetidas à extração de DNA e PCR para a pesquisa do gene da beta-globina para avaliação da qualidade do DNA extraído. Em paralelo, foi realizado um estudo de questões comportamentais dos pacientes. **Resultados:** Todas as amostras apresentaram o diagnóstico positivo para o gene da betaglobina. O HPV foi diagnosticado em 23,2% das amostras analisadas. **Conclusão:** O vírus esteve presente em 29 dos 125 pacientes, sem que estes apresentassem qualquer manifestação clinicopatológica relacionada com o HPV. Quanto ao comportamento social dos pacientes, concluiu-se que a prática de sexo oral está correlacionada de forma estatisticamente significativa com a presença viral, além de o HPV ter sido estatisticamente mais prevalente em pacientes do sexo feminino.

¹ Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Mestrando).

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Fundação Hermínio Ometto - UNIARARAS (Co-orientadora).

³ Graduação em Farmácia (aluno de iniciação científica vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas).

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Fundação Hermínio Ometto - UNIARARAS (Orientadora).
UNIARARAS-FHO.

Endereço para correspondência: Julio Cesar Betiol. Av. Leme, nº 770, Parque das Árvores. Araras - SP. CEP: 13604-186.
UNIARARAS.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 5 de outubro de 2011. cod. 8820.

Artigo aceito em 12 de maio de 2012.

INTRODUÇÃO

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae*. São pequenos, epiteliotrópicos e têm cerca de 55 nm de diâmetro. Apresentam um genoma composto de 7200 a 8000 pares de base com peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons. O HPV é formado por um capsídeo que possui 72 capsômeros de estruturas icosaédricas, sem envelope lipoproteico e uma única molécula circular dupla de DNA¹. Seu genoma é dividido em E (early - codifica as proteínas que serão produzidas inicialmente) e L (late - codifica as proteínas que serão produzidas após as proteínas da região E). Essas duas regiões representam, respectivamente, 45% e 40% do genoma viral e contêm as open reading frames (ORFs) E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2. Sabe-se que o gene E1 está envolvido com a manutenção e replicação do DNA viral; E2 regula a transcrição viral e E4 codifica uma proteína que destrói a queratina citoplasmática, produzindo a imagem do halo de coilocitose. Acredita-se que E5, E6 e E7 estão envolvidas com a transformação e degradação celular; enquanto a L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral. Entre as regiões E e L, está a região não codificadora denominada LCR (long control region) ou URR (upstream regulatory region), representando 15% do genoma viral envolvido no controle da expressão dos genes virais².

A infecção pelo HPV é basicamente de forma sexual. Como tal, tanto os homens como as mulheres estão envolvidos na cadeia epidemiológica da infecção e são capazes, ao mesmo tempo, de serem portadores assintomáticos, transmissores e vítimas da infecção pelo HPV. Neste sentido, os fatores de risco estão claramente associados com o comportamento sexual do indivíduo. Os mais importantes são: idade precoce no início das primeiras relações sexuais, número elevado de parceiros sexuais ao longo da vida e contatos sexuais com indivíduos de alto risco (no caso dos homens, contato frequente com as mulheres que praticam prostituição; já no caso das mulheres, relação com homens com múltiplas parceiras sexuais)³.

O HPV infecta células epiteliais e mucosas, podendo causar uma variedade de lesões hiperplásicas. Estes vírus, portanto, podem ser mucosotrópicos, que infectam as mucosas oral, respiratória e genital; e cutaneotrópicos, encontrados em indivíduos imunocompetentes e em portadores de epidermodisplasias verruciformes⁴. Como o HPV se limita apenas a infectar a camada epitelial, não ultrapassando a membrana basal, a exposição imunológica primária deve ocorrer por meio de mecanismos existentes nesta camada. A membrana celular infectada expressa somente a proteína E5, e esta pequena quantidade de antígenos virais de superfície pode permitir a atenuação da resposta imune. A E5 se liga e inativa a proteína necessária para processar antígenos. Como a célula epitelial não é boa apresentadora de antígenos, o HPV permanece

dentro dela sem ser reconhecido pelo sistema imunológico. Devido ao fato do HPV não causar lise ou morte da célula do hospedeiro, o vírus permanece isolado do contato de células do sistema imune, que iniciaria o processo de reconhecimento⁵.

A infecção viral pode gerar lesões clínicas de forma localizada, subclínica ou latente. De uma maneira geral, o HPV segue o ciclo produtivo viral clássico: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação do DNA e maturação. Mas, em alguns casos, esse processo não chega a acontecer completamente, uma vez que o vírus pode integrar-se ao genoma das células hospedeiras e induzir à carcinogênese das mesmas. Nas lesões benignas, o vírus está na forma circular, chamada episomal, não integrado ao genoma da célula hospedeira, e em grande número de cópias. Nas lesões malignas, apresenta-se na forma integrada ao genoma da célula hospedeira. Entretanto, é possível encontrar formas episomais nas células malignas e, uma vez estando integrado, o vírus não pode ser revertido à sua forma episomal⁶.

Os tipos virais de alto e baixo risco de malignidade se diferenciam de acordo com a capacidade de transformação das oncoproteínas codificadas pelos genes E6 e E7. As oncoproteínas E6 e E7 se ligam, respectivamente, às proteínas p53 e pRB, reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do câncer. Este fenômeno causa o desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, o que provoca alterações genéticas adicionais que levam ao câncer por impedirem a apoptose, causando o fenômeno de imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco, não sendo observados nos de baixo risco⁷.

Estima-se que, no Brasil, haja cerca de 500 mil a 1 milhão de casos novos por ano da infecção pelo HPV, enquanto são registrados 80 mil casos de AIDS, 200 mil a 500 mil casos de herpes, 100 mil casos de sífilis e 800 mil ocorrências de gonorreia⁸. A presença na mucosa oral dos tipos anogenitais, HPV 6/11 e 16/18, poderia significar transmissão orogenital, o que tornaria este vírus um importante cofator no desenvolvimento do câncer oral, assim como é considerado no colo uterino⁹. A prevalência de HPV em mucosa oral, macroscopicamente normal, é muito variável na literatura: varia de 0 a 81,1%, com média de 10%. Nem sempre as infecções são visíveis macroscopicamente. Assim, a infecção pelo HPV pode ser classificada em: (a) latente, a qual só pode ser diagnosticada por métodos de biologia molecular; (b) subclínica, na qual não há sintomas clínicos, mas há alterações sutis que podem ser detectadas por métodos diagnósticos, como peniscopia, colpocitologia, colposcopia e/ou biópsia; (c) clínica, na qual há lesões evidentes ao exame clínico. Não se sabe, do ponto de vista molecular, como uma infecção por HPV permanece latente e outra, por outro lado, desenvolve lesão macroscópica decorrente de intensa replicação viral¹⁰.

Os avanços no campo da genética e biologia molecular têm contribuído decisivamente para o estudo desses vírus. De todas as técnicas de detecção de DNA do HPV, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais sensível¹¹.

O papilomavírus humano (HPV) se destaca como uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais comuns no mundo. O Ministério da Saúde registra a, cada ano, 137 mil novos casos no país. Uma vez que o diagnóstico viral pode ser feito ainda na fase latente da infecção, torna-se possível o acompanhamento do paciente, a fim de alertar para o tratamento adequado de lesões ou alterações que possam surgir como consequência da progressão da infecção viral. Deste modo, o estudo propõe-se a determinar a prevalência do HPV em mucosa oral de pacientes que não apresentam qualquer tipo de lesão e, concomitantemente, avaliar se hábitos sexuais e sociais, como a atividade sexual, presença de parceiro fixo, relação com prostitutas, prática de sexo oral, uso de preservativos e tabagismo, estão associados com a presença viral.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi previamente submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico da instituição, sob a seguinte numeração: 840/2007.

Seleção das amostras

Foram coletadas 125 amostras de raspado de mucosa oral, de homens e mulheres escolhidos aleatoriamente, os quais foram esclarecidos sobre a pesquisa, preencheram o questionário com questões comportamentais e assinaram o termo de consentimento, aceitando participar da pesquisa. Para a coleta das amostras, foi utilizada a escovinha "Campos da paz" e o material foi armazenado em tubos do tipo *Eppendorf*[®], contendo solução salina 0,9%. Os mesmos foram congelados para conservação até a extração.

Questionário Comportamental

O questionário comportamental foi aplicado após prévia explicação sobre a importância do mesmo na pesquisa e esclarecimento de que seus dados seriam mantidos em sigilo (Quadro 1).

Análise Estatística

O teste exato de Fischer foi utilizado, como ferramenta estatística, a fim de verificar se a prevalência do HPV esta relacionada, de maneira estatisticamente significativa, ao sexo e aos hábitos de vida dos pacientes. Um valor de *p* menor que 0,05 demonstra a existência de correlação. Também foram obtidos valores de intervalo de confiança (C.I.), estabelecido em 95% e *Odds Ratio*. Dados estatísticos foram produzidos pelo programa SISA[®] (Simple Interactive Statistical Analysis).

Quadro 1. Referente ao questionário comportamental.

Questionário comportamental
Número de identificação: _____
Cor: _____
Idade: __ Sexo: () F ou () M
Estado Civil: _____
Profissão: _____ Curso: _____
Já praticou relações sexuais? () Sim () Não
Idade da primeira relação sexual: _____
Parceiros Fixos: () Sim () Não
Número de Parceiros durante 1 ano: () 1 a 3 () 4 a 7 () 10 ou mais
Já praticou relações sexuais com profissionais do sexo? () Sim () Não
Praticante de Sexo Oral: () Sim () Não
Usuário de Preservativos: () Sim () Não
Frequência do uso de Preservativo: () em todas as relações () Algumas vezes () Nunca
Há ou Houve presença de lesões na boca: () Sim () Não
Frequência: () Frequentemente () Casualmente () Raramente
Possui Herpes ou HPV? () Sim () Não () Desconhece
Seu parceiro possui Herpes ou HPV? () Sim () Não () Desconhece
Já teve alguma DST? _____
Fumante? () Sim () Não
Usuário de medicamentos (imunossupressores)? () Sim () Não

Extração do DNA

Procedeu-se, inicialmente, com agitação das amostras em vórtex (AP56 - Phoenix - Brasil) e seguido da retirada de alíquotas de 300 µl, que foram transferidas para outro recipiente. O mesmo foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado, foram adicionados 600 µl de hidróxido de sódio (NaOH) a 50 mM. Levou-se ao "Banho Maria" (MA159 - Marconi - Brasil) a 95°C por 5 minutos e logo após adicionou-se 60 µl de tris-HCL 1 M. O material extraído foi congelado.

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Todas as amostras foram submetidas a PCR, utilizando a betaglobina para testar o método de extração e evitar falsos negativos, uma vez que esse gene é comum a todos os seres humanos, devendo, assim, aparecer em todas as amostras.

Para preparar o *mix* de reação da PCR para a betaglobina, utilizou-se um *Eppendorf*[®] de 1,5 ml. A mistura de reação é composta, respectivamente, por: 12,5 µl de água deionizada e autoclavada, 2,5 µl de tampão de reação (10x - *Invitrogen*[®]), 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM - *Invitrogen*[®]), 2,5 µl de solução de dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato) (2 mM - *Invitrogen*[®]), 1,0 µl do par de *primers*¹² GH₂0 (GAAGAGC-

CAAGGACAGGTAC)/PC04 (CAACTTCATCCACGTTCCACC) a 10 pmol/μl (*Invitrogen*®), 4 μl de DNA e 0,5 μl de *Taq polimerase* (5U/μl - *Invitrogen*®), totalizando um volume de 25 μl. Em todos os lotes amplificados, foram utilizados controles negativos (4 μl água no lugar de DNA) e controles positivos para detecção de possíveis contaminantes durante a reação.

Para preparar o *mix* de reação da PCR para o HPV, utilizou-se um *Eppendorf*® de 1,5 ml. A mistura de reação é composta, respectivamente, por: 12,0 μl de água deionizada e autoclavada, 2,5 μl de tampão de reação (10x - *Invitrogen*®), 1,5 μl de MgCl₂ (50 mM - *Invitrogen*®), 2,5 μl de solução de dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato) (2 mM - *Invitrogen*®), 1,0 μl par de *primer*² geral para HPV MY09 (GT CCM AAR GGA WAC TGA TC*) / MY11 (GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG*) a 10 pmol/μl (*Invitrogen*®), 4 μl de DNA e 0,5 μl de *Taq polimerase* (5U/μl - *Invitrogen*®), totalizando um volume de 25 μl. Em todas as análises, foram utilizados controles negativos (4 μl água no lugar de DNA) e controles positivos para detecção de contaminações e atuar como padrões da presença viral.

Os ciclos térmicos para as reações de PCR foram realizados no Peltier Thermal Cycler® (*Biocycler Termocicladores*), sendo o programa de amplificação da betaglobina composto de: Um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos sucessivos compostos de três etapas (desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 60°C por 1 minuto e síntese a 72°C por 1 minuto) e um ciclo final a 72°C por 10 minutos. O programa de execução de PCR para o *primer* geral do HPV foi composto de: um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos sucessivos compostos de três etapas (desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 40°C por 1 minuto e síntese a 72°C por 1 minuto) e um ciclo final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (0,75 g de agarose em 50 ml de tampão TBE 1x e 5,0 μl de brometo de etídeo) em cuba horizontal (Horizon 11-14® - *Lifetechnologies* - USA) sob uma diferença de potencial de 100 volts por uma hora. O gel foi analisado em transluminador (foto-Prep®) no qual amostras com bandas de 268 pb foram consideradas positivas para betaglobina. Para o produto proveniente da amplificação com o *primer* geral para o HPV, foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de Bis-Acrilamida a 10% (23,33 ml de Bis-Acrilamida; 4,9 ml de Glicerol; 7 ml de TBE 10x; 52,5 μl de Temed; 1050 μl de persulfato de potássio e 34,1 ml de água destilada), o qual foi levado à diferença de potencial de 120 volts por 3 horas em cuba vertical (Model V15-17® - *Lifetechnologies* - USA) e o gel corado pelo protocolo de nitrato de prata¹³, para visualização das bandas.

RESULTADOS

Foi encontrada a presença do DNA viral em 23,2% (29/125) das amostras, sendo que todas foram positivas para a amplificação do gene da betaglobina, garantindo a fidedignidade do experimento.

No que se refere ao questionário comportamental, dentre as variantes abordadas (Sexo, Atividade Sexual, Parceiro Fixo, Relação Sexual com Prostitutas, Prática de Sexo Oral, Uso de Preservativo e Tabagismo), somente o sexo dos pacientes (OR = 2,2404, CI [0,9339 - 5,3749], *p* = 0,03631) e a prática de sexo oral (OR = 0,0473, CI [0,0095 - 0,2358], *p* = 0,0473) estiveram correlacionados de forma estatisticamente significativa com a presença do HPV (Figura 1).

HPV	Sexo		Atividade Sexual		Parceiro Fixo	
	Masculino	Feminino	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Presente	12	17	25	4	16	13
Ausente	23	73	89	7	66	30
valor de p	0,03631		0,15267		0,0711	
Odds Ratio	2,2404		0,4916		0,5594	
C.I. 95%	0,9339 - 5,3749		0,1332 - 1,815		0,2392 - 1,3083	
HPV	Prática de Sexo Oral		Uso de Preservativo		Tabagismo	
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Presente	20	9	22	7	5	24
Ausente	94	2	76	20	14	82
valor de p	0,00002		0,18397		0,21047	
Odds Ratio	0,0473		0,8271		1,2202	
C.I. 95%	0,0095 - 0,2358		0,3095 - 2,2101		0,399 - 3,7318	

Figura 1. Teste Exato de Fischer (Relação estatisticamente significativa se *p* < 0,05).

Dentre os indivíduos abordados pela pesquisa, 37 (29,6%) voluntários eram homens na faixa etária de 17-54 anos e 88 (70,4%) eram mulheres na faixa etária de 17-44 anos. Predominando a faixa etária dos 18-21 em ambos os sexos. Das 29 amostras HPV positivas, 41,4% (12/29) eram homens e 58,6% (17/29) eram mulheres; 17,24% (5/29) eram tabagistas; 24,13% (7/29) disseram não utilizar preservativos em todas as relações sexuais; 68,96% (20/29) declararam ser praticantes de sexo oral; 13,79% (4/29) não tinham iniciado a vida sexual; 44,82% (13/29) não tinham parceiros fixos e 13,79% (4/29) já tiveram relações com prostitutas.

DISCUSSÃO

Diversos efeitos citopáticos relacionados à infecção pelo HPV já estão bem estabelecidos na literatura (koilocitose, alargamento nuclear, megalocitose, binucleação, dentre outros), bem como lesões intraepiteliais, que variam de baixo grau (LSIL) a alto grau (HSIL), podendo evoluir a carcinoma de célula escamosa (SCC)¹⁴. Entretanto, o HPV pode apresentar-se assintomático, uma vez que a maioria das infecções são subclínicas ou latentes. Segundo Xavier et al.¹⁰, a prevalência de HPV em mucosa oral macroscopicamente normal é muito variável na literatura: varia de 0 a 81,1%, com média de 10%. Castro & Bussoloti¹⁵ afirmam que as taxas de detecção podem variar de 0 a 100%, mesmo com o uso de métodos mais sensíveis como a PCR, e citam que a grande discrepância dos resultados pode ser atribuída aos erros na hora da coleta do material, os quais podem comprometer os resultados finais. Em maior proporção,

quando comparado aos nossos resultados, Peixoto⁵ diagnosticou em sua coorte, composta por 100 pacientes sem lesões em mucosa oral, prevalência viral de 81%, embora, diferentemente do nosso estudo, não tenha encontrado relação estatisticamente significativa entre a prática de sexo oral e a presença do HPV. Porém, em concordância com nossos resultados, Cardesa & Nadal¹⁶ relatam que a prática de sexo oral é um dos principais fatores de risco para a progressão da biopatologia desenvolvida pelo HPV. Em relação ao tabagismo e ao sexo, Gilison et al.¹⁷ relataram que o HPV foi mais prevalente em homens e tabagistas de forma estatisticamente significativa, além de relatar uma prevalência de 6,9% de HPV na população geral dos Estados Unidos da América, quando avaliaram uma coorte composta por 5579 indivíduos, sem prévia seleção. Kreimer et al.¹⁸, analisando 1688 amostras de mucosas orais de homens saudáveis, em concordância com nossos resultados, não encontraram associação estatisticamente significativa entre o número de parceiros sexuais, uso de preservativo, bem como a atividade sexual e a presença do HPV em mucosa oral. Segundo Castellsagué³, o uso de preservativos é um fator que pode diminuir os riscos de transmissão de HPV, porém, não garante total proteção.

CONCLUSÕES

O papilomavírus humano está presente em 23,2% dos 125 casos estudados. Uma vez que estes pacientes não apresentaram quaisquer manifestações clínico-patológicas correlacionadas com a presença do vírus, o HPV pode estar presente em mucosas orais saudáveis em proporções significativas. Embora estudos de coortes americanas tenham encontrado maior prevalência de HPV em mucosas orais de homens, dentre os pacientes abordados pelo estudo, as mulheres e/ou os praticantes de sexo oral compuseram o grupo de risco no qual o HPV foi prevalente de forma estatisticamente significativa.

Embora outros hábitos de vida não tenham atingido a significância estatística, estudos com um maior número de pacientes devem ser conduzidos, uma vez que fatores como o tabagismo, a abdicção do uso de preservativos, bem como múltiplos parceiros sexuais e a atividade sexual, são fatores que aumentam as chances de transmissão e/ou infecção pelo HPV.

REFERÊNCIAS

1. Castro TMPG, Neto CER, Scala KA, Scala WA. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(4):546-50.
2. Bettini Jde S, Soares EG, Duarte G, Simões RT, Simões AL. PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytol.* 2003;47(4):545-9.
3. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
4. Saraiva ACM. Implicações do gene TP53 e do vírus do papiloma humano no câncer de próstata [Tese de doutorado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia;2002.
5. Peixoto AP. Detecção do Papilomavírus Humano na cavidade bucal de pacientes com infecção por este vírus na mucosa cervico-vaginal [Dissertação de mestrado]. Bahia: Universidade Federal da Bahia;2006.
6. Cavalcanti SMB, Carestiatto FN. Infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualizações sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnosticados. *DST. J Bras Doenças Sex Transm.* 2006;18(1):73-9.
7. Salvia PND. Indicadores de doença residual no seguimento de pacientes conizadas por lesão intraepitelial escamosa de alto grau [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Anatomia Patológica;2004.
8. Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1ª edição, São Paulo: BG Cultural; 2000.
9. Soares CP, Malavazi I, dos Reis RI, Neves KA, Zuanon JA, Benatti Neto C, et al. Presença do papilomavírus em lesões malignas de mucosa oral. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(5):439-44.
10. Xavier SD, Filho IB, Carvalho JM, Framil VMS, Castro TMPPG. Frequência de Aparecimento de papilomavírus humano (HPV) na mucosa oral de homens com hpv anogenital confirmado por biologia molecular. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2007;11(1):36-44.
11. Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69(4):553-9.
12. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
13. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques.* 1994;17(5):914-21.
14. Méndez Toro L, Rodríguez Meza A, López de Sánchez M, Toro de Méndez M. HPV infection associated with nonclassic cytological signs in patients from Mérida, Venezuela. *Invest Clin.* 2011;52(2):162-9.
15. Castro TPPG, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(2):272-82.
16. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat.* 2011;20(3):161-73.
17. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307(7):693-703.
18. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):172-82.