

Detecção do papilomavírus humano em lesões verrucosas orais por meio da técnica de hibridização *in situ*

Detection of human papillomavirus in oral warts using in situ hybridization

Cristhiane Almeida LEITE¹
Renata Rodrigues ACAY²
Péricles Martim RECHE¹
Oliver Guilherme da SILVA¹
Suzana Orsini Machado de SOUSA³

RESUMO

Objetivo: Analisar a prevalência do papilomavírus humano e seus subtipos em 50 lesões verrucosas orais, sendo 20 papilomas, 17 condilomas acuminados e 13 verrugas vulgares.

Método: O método de escolha foi a hibridização *in situ* utilizando sondas biotinizadas de amplo espectro para papilomavírus humano e sondas específicas para papilomavírus humano 6/11, papilomavírus humano 16/18 e papilomavírus humano 31/33.

Resultados: Dez dos 50 casos (20%) de lesões verrucosas orais apresentaram positividade para a reação de hibridização *in situ* para a sonda de amplo espectro, sendo três (3/20) papilomas, cinco (5/17) condilomas e duas (2/13) verrugas vulgares. Destes, oito (16%) apresentaram positividade para a sonda papilomavírus humano 6/11, sendo cinco condilomas acuminados, um papiloma e duas verrugas vulgares. Três casos (6%) apresentaram positividade para a sonda papilomavírus humano 16/18, sendo dois casos de condilomas acuminados e o outro caso de papiloma. Dos seis casos positivos para a sonda papilomavírus humano 31/33 (12%), quatro eram condilomas e dois eram papilomas.

Conclusão: A presença do papilomavírus humano (20%) encontrada neste estudo foi baixa, porém dentro da média encontrada na literatura, mostrando que a hibridização *in situ* pode não detectar a presença de DNA viral quando em quantidades pequenas; nestes casos, a realização de outros métodos de detecção de papilomavírus humano pode ser necessária.

Termos de indexação: patologia bucal; infecções por papilomavírus; hibridização *in situ*.

ABSTRACT

Objective: The human papillomavirus is a group of DNA epitheliotrophic viruses associated with the etiology of benign and malignant oral warts. More than 100 types have been identified and among them, 24 have been found into the oral cavity. The aim of this study was to analyze human papillomavirus prevalence and its subtypes in 50 oral warts, of which 20 were squamous papillomas, 17 condyloma acuminatum and 13 verruca vulgaris.

Method: In situ hybridization was used with biotinylated DNA probes for wide-spectrum HPV and with specific probes for human papillomavirus 6/11, human papillomavirus 16/18 and human papillomavirus 31/33.

Results: Human papillomavirus was present in ten (20%) of the 50 oral wart cases, 03 (3/20) squamous papillomas, 05 (5/17) condyloma acuminatum and 02 (2/13) verruca vulgaris. Of these, 8 (16%) were positive to the HPV probe 6/11 being 5 condyloma acuminatum, 1 squamous papilloma and 2 verruca vulgaris. Three cases (6%) demonstrated positivity to the human papillomavirus probe 16/18, with 2 being cases of condyloma and the other a case of squamous papilloma. Of the six positive cases to the human papillomavirus probe 31/33, (12%) 4 were condyloma acuminatum and 2 squamous papillomas.

Conclusion: The human papillomavirus expression (20%) found in this study was low, but within the average found in the literature. Nonetheless, in addition to *in situ* hybridization, other methods may be necessary for confirming the presence of human papillomavirus.

Indexing terms: pathology oral; papillomavirus infections; *in situ* hybridization.

INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) constitui um grupo de vírus DNA oncogênico e está envolvido na indução de inúmeras lesões hiperplásicas, papilomatosas

e verrucosas no epitélio que reveste a pele e mucosa em vários locais, como região anogenital, uretra, laringe, região traqueobrônquica, cavidade nasal e oral¹⁻². São vírus epiteliotrópicos e mais de 120 tipos de HPV têm sido identificados em várias lesões. Na cavidade oral, 24 tipos (HPVs-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35,

¹ Universidade de Cuiabá, Hospital Geral Universitário. Cuiabá, MT, Brasil.

² Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. São Paulo, SP, Brasil.

³ Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. Av. Prof. Lineu Prestes, n. 2227, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. Correspondência para / Correspondence to: S O M SOUSA (scmsouza@usp.br).

45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) são associados com lesões benignas e 12 tipos (HPVs-2, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 57) com lesões malignas. Desses, HPV-6 e HPV-11 têm um baixo risco de associação com malignidade e são chamados de benignos ou de baixo risco, enquanto outros, como HPV-16 e HPV-18, são fortemente associados com malignidade e são chamados de malignos, oncogênicos ou de alto risco³⁻⁴.

As lesões benignas associadas ao HPV em cavidade oral são: papiloma e condiloma acuminado, associados principalmente aos tipos 6 e 11, verruga vulgar, associada principalmente aos tipos 2 e 57, e hiperplasia epitelial focal, associada principalmente aos tipos 13 e 32. Para as lesões malignas podem ser citados o carcinoma epidermóide e o carcinoma verrucoso^{2,5-6}.

Lesões verrucosas causadas pelo HPV podem se apresentar em qualquer localização na cavidade oral como únicas ou múltiplas, com aspecto de couve-flor, exofíticas, sésseis ou pediculadas, e são denominadas papiloma escamoso, condiloma acuminado ou verrugas⁷⁻⁸.

Inúmeras técnicas são utilizadas para o diagnóstico do HPV na mucosa oral. A biópsia permite o estudo histopatológico de amostra representativa da lesão e, pelos aspectos morfológicos, pode sugerir a infecção pelo HPV. Entretanto, a coloração de rotina com hematoxilina e eosina não permite a confirmação da presença do HPV, o que é possível apenas por meio das técnicas de biologia molecular⁹.

Os métodos de identificação do HPV nos tecidos humanos variam segundo a sensibilidade e especificidade do vírus. Pode-se citar os métodos de baixa sensibilidade, que incluem a microscopia eletrônica, a imunoistoquímica, a imunofluorescência e a hibridização *in situ* (ISH), análises de moderada sensibilidade, que incluem *Southern blot*, *dot blot* e hibridizações *blot* reversas, e as de alta especificidade, que incluem a reação da polimerase em cadeia¹. A reação da polimerase em cadeia e a hibridização *in situ* são os métodos mais amplamente utilizados: o primeiro por ser comprovadamente o mais sensível e o segundo por permitir a localização morfológica das células infectadas no tecido, além do custo mais baixo e tempo menor¹⁰⁻¹¹.

Na tentativa de solucionar as limitações da reação da polimerase em cadeia e da hibridização *in situ*, mais recentemente dois novos métodos foram propostos: reação da polimerase em cadeia *in situ* e amplificação de sinal para hibridização *in situ* (CSA-ISH), proporcionando localização morfológica na reação da polimerase em cadeia e maior sensibilidade na hibridização *in situ*¹²⁻¹³. A CSA-ISH mostrou-se suficientemente sensível para detectar uma ou duas cópias de DNA do HPV, tendo supostamente sensibilidade comparável à técnica da reação da polimerase em cadeia^{12,14}.

A literatura traz inúmeros estudos relativos à identificação do HPV em lesões benignas orais, como o papiloma, o condiloma acuminado e verruga vulgar, mas o

que se observa é uma variabilidade muito grande em relação à técnica utilizada, o número de casos estudados e os resultados encontrados. Estes fatos dificultam o estabelecimento de parâmetros como a presença, o tipo de HPV e sua relação como fator etiológico único e exclusivo dessas lesões, e também como um meio que facilite o diagnóstico histológico. Exceção deve ser feita aos casos de hiperplasia epitelial focal, que estão quase exclusivamente associados ao HPV13 e HPV32, e para os casos de verruga vulgar, nos quais a literatura mostra associação aos HPVs 2 e 57¹⁵⁻¹⁷.

Tendo em vista a multiplicidade de trabalhos encontrados na literatura, neste estudo procurou-se avaliar a prevalência do HPV e seus subtipos em lesões verrucosas orais (papiloma, condiloma acuminado e verruga vulgar). Sabendo da importância dos dados clínicos como um fator importante na conclusão diagnóstica destas lesões, o perfil do paciente foi também avaliado. Para a detecção do HPV foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* com amplificação do sinal (CSA-ISH), devido às inúmeras vantagens que esta técnica oferece, por especificar os subtipos encontrados nos casos positivos.

MÉTODOS

Foram utilizados 50 casos de lesões verrucosas orais, sendo 20 casos de papiloma, 17 de condiloma acuminado e 13 de verruga vulgar. O material foi proveniente do arquivo do serviço de patologia bucal da Universidade de São Paulo e encontrava-se em blocos de parafina. Os diagnósticos foram revistos a partir de cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina, seguindo critérios histológicos descritos na literatura¹⁶. Dados referentes à idade, gênero dos pacientes, raça e local da lesão também foram coletados e analisados.

Para detecção das partículas virais foi realizada a técnica de hibridização *in situ* com o uso de sondas biotiniladas HPV de amplo espectro (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 56) e sondas específicas HPV6/11, HPV 16/18 e HPV 31/33 (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Para a evidenciação da sonda foi utilizado o sistema Genpoint da Dako.

Reação de hibridização *in situ*

A reação de hibridização *in situ* foi realizada em materiais embebidos em parafina, de onde foram obtidos cortes de 5 µm de espessura que foram estendidos em lâminas silanizadas, desparafinizados e re-hidratados. As lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica em forno de microondas (TRS – Target Retrieval Solution 1:10 - DakoCytomation, USA). Os cortes foram incubados com a sonda biotinilada de amplo espectro para DNA do HPV (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Após, permaneceram em câmara úmida a 37 °C durante 21 horas e 15 minutos.

No segundo dia, para a visualização da reação de hibridização utilizou-se o sistema catalisador de amplificação de sinal para hibridização *in situ* (CSA-ISH) GenPoint™ (DakoCytomation, USA), conforme instruções do fabricante. As lâminas receberam um banho em solução de estrigência à temperatura de 55°C. Em seguida, foi incubado o anticorpo primário (diluição 1:200) por 15 minutos. A fim de amplificar o sinal de hibridização, os cortes ficaram em contato com biotilil-tiramida antes de receberem o anticorpo secundário. Os cortes foram revelados pelo cromógeno diaminobenzidina e, então, contra-corados pela hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e montados em resina Permount.

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz e, nos casos positivos, a reação foi repetida substituindo-se a sonda de amplo espectro por sondas específicas para os tipos 6/11, 16/18 e 31/33 (DakoCytomation, USA). Como controle negativo não foi realizada a incubação com o anticorpo primário fornecido pelo sistema GenPoint™, e como controle positivo foi utilizado um caso de lesão oral de condiloma acuminado positivo para o HPV, previamente testado com as sondas utilizadas nas reações.

Foi construído um arquivo, contendo os dados da pesquisa com as variáveis: gênero, idade, raça, localização da lesão e positividade para as sondas utilizadas. Os dados foram digitados mediante a utilização do programa Epi-info.

Análise estatística

Foram utilizados os testes de Mann-Whitney – empregado para testar diferenças de medianas – e o não-paramétrico de Fisher. As prevalências e seus intervalos de 95% de confiança foram calculados para quantificar as associações encontradas. O nível de significância estatística para os testes foi estipulado em 5%.

RESULTADOS

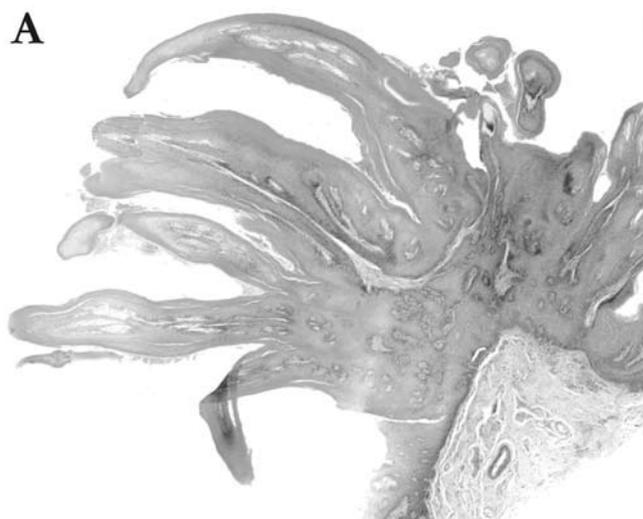
As lesões de papiloma tiveram maior predileção pelo gênero feminino, raça branca, 4ª e 7ª décadas de vida e em região de palato mole. As lesões de condiloma mostraram maior predileção pelo gênero masculino, raça branca, 5ª década de vida e em região de lábio inferior. Quanto às lesões de verruga, o gênero masculino foi o mais acometido, na 1ª década de vida, raça branca, e os locais acometidos foram o lábio inferior e a comissura labial. Apesar das diferenças encontradas para as variáveis mencionadas (gênero, raça, idade e local da lesão) nas lesões estudadas, os resultados não mostraram significância estatística.

Dez dos 50 casos (20%) de lesões verrucosas orais apresentaram sinal de positividade para a reação de hibridização para a sonda HPV de amplo espectro, em diferentes intensidades e em variados números de células. As células positivas foram observadas predominantemente

em camadas superficiais do epitélio, mas alguns casos apresentaram células da camada espinhosa positivas. Destes, três casos (15%) correspondiam a lesões de papiloma, cinco casos (29,41%) a lesões de condiloma acuminado e dois casos (15,38%) eram de verruga vulgar (Figura 1). Dos dez casos positivos para a sonda HPV de amplo espectro, oito (16%) apresentaram positividade para a sonda HPV 6/11, três (6%) para a sonda HPV 16/18 e seis para a sonda HPV 31/33 (12%). Dos oito casos positivos para a sonda HPV 6/11, cinco correspondiam a lesões de condiloma, um de papiloma e dois de verruga vulgar. Para os três casos positivos para a sonda HPV 16/18, dois casos correspondiam a lesões de condiloma e o outro caso correspondia a lesão de papiloma. Dos seis casos positivos para a sonda HPV 31/33, quatro eram lesões de condiloma e os dois restantes eram lesões de papiloma. Apenas dois casos de condiloma apresentaram sinal de hibridização para todas as sondas específicas, e estes eram provenientes de pacientes HIV positivos. A distribuição desses resultados pode ser visualizada na Tabela 1.

Foram também analisados aspectos sociodemográficos como gênero, raça, idade e locais acometidos para as lesões verrucosas orais que apresentaram positividade para a sonda HPV de amplo espectro. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 2, 3 e 4.

Apesar de o sexo masculino ter sido três vezes mais positivo que o gênero feminino, e a raça negra ter sido quase duas vezes mais positiva que a raça branca para o HPV, provavelmente devido ao baixo número de casos positivos neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa para estes resultados. Mesmo após o agrupamento das faixas etárias com maior positividade, não houve diferença estatisticamente significativa, ou seja, não houve diferença entre as faixas etárias quanto à positividade para o HPV. As regiões acometidas que apresentaram maior positividade para o HPV foram, em ordem decrescente, mucosa jugal, gengiva, lábio inferior, língua, comissura labial e palato mole.



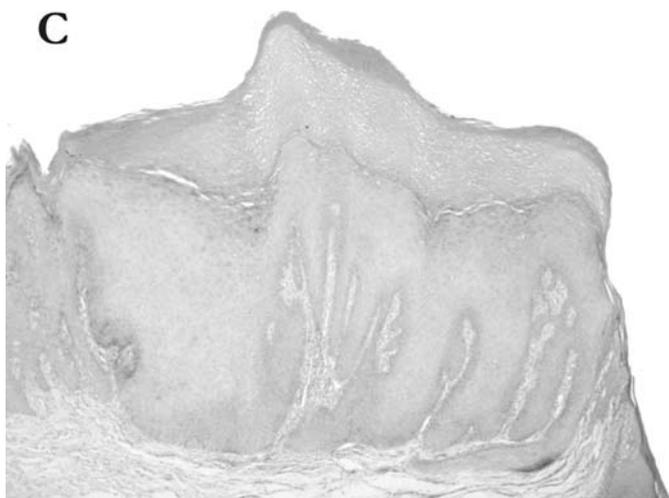
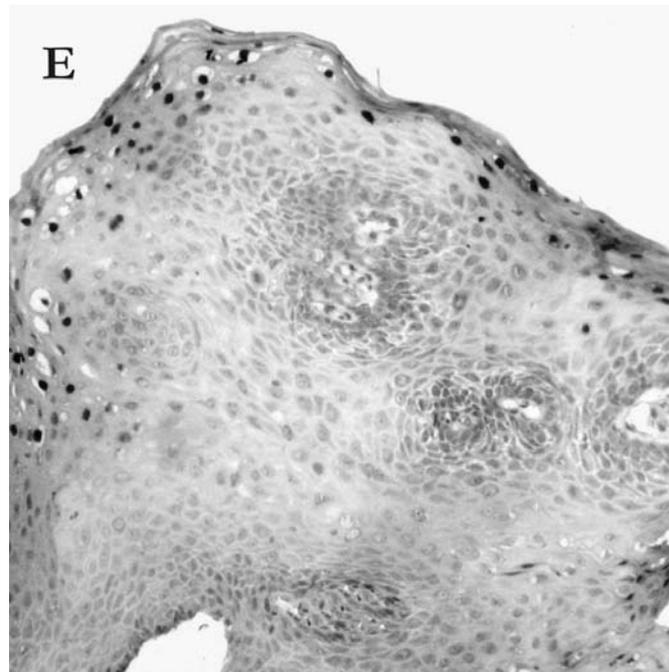
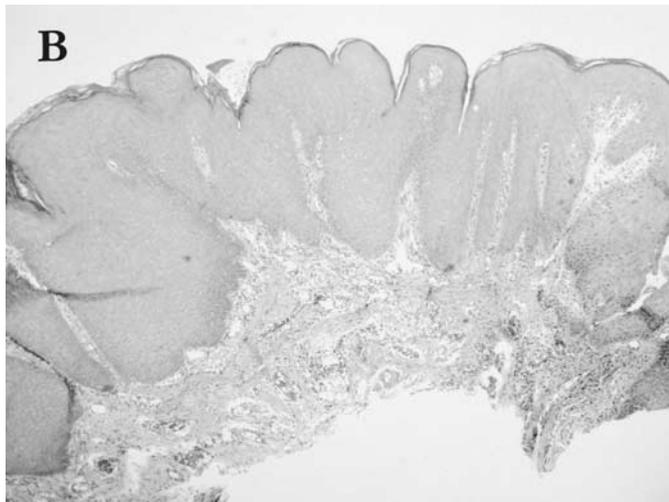


Figura 1. **A)** Observa-se corte de papiloma exibindo projeções papilíferas típicas (HE, aumento original 40x); **B)** Fragmento de condiloma acuminado exibindo no epitélio de superfície hiperqueratose, acantose e projeções papilares embotadas e largas em direção ao tecido conjuntivo (HE, aumento original 40x); **C)** Corte de verruga vulgar, onde se nota a presença de cristas epiteliais alongadas que tendem a convergir para o centro da lesão e superfície hiperqueratinizada (HE, aumento original de 40x); **D)** Positividade para o HPV em papiloma, onde se nota núcleos de coloração castanho-escuro em células das camadas superficiais e intermediárias (hibridização *in situ* – sonda de amplo espectro (aumento original de 100x); **E)** Positividade para o HPV em células das camadas superficial e intermediária – Hibridização *in situ* – sonda de amplo espectro (aumento original de 100x); **F)** Positividade para o HPV em poucas células das camadas superficial e intermediária – Hibridização *in situ* – sonda de amplo espectro (aumento original de 100x).

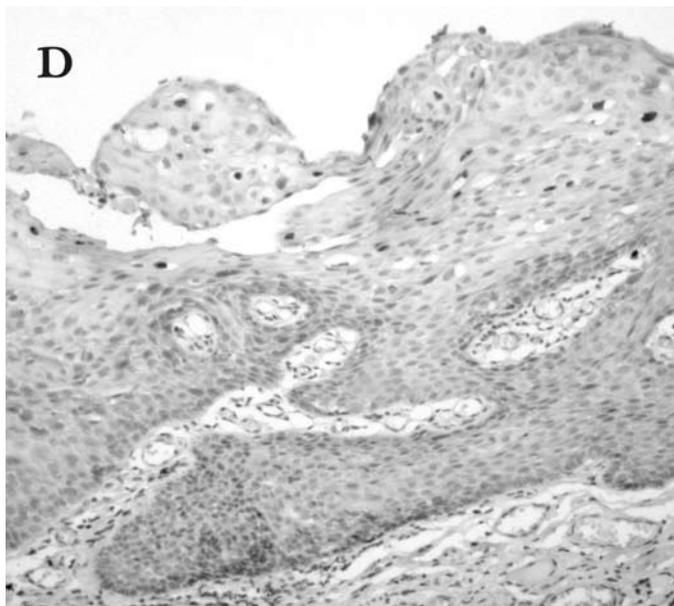


Tabela 1. Distribuição quanto à positividade das lesões estudadas para as sondas.

Lesão	Tipos de HPV				
	ISH +	HPV amplo	HPV 6/11	HPV 16/18	HPV 31/33
Condiloma	5 (29,41%)	5 (29,41%)	5 (29,41%)	2 (11,76%)	4 (23,53%)
Papiloma	3 (15%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	2(10%)
Verruga	2 (15,38%)	2 (15,38%)	2 (15,38%)	0	0
Total	10 (20%)	10 (20%)	8 (16%)	3 (6%)	6 (12%)

Tabela 2. Distribuição do resultado da sonda HPV de amplo espectro segundo o gênero.

Gênero	Amplo				Total	RP	IC _{95%}	p-valor do χ^2
	Positivo		Negativo					
	nº	%	nº	%				
Masculino	8	28,57	20	71,43	28	3,14 (0,74-13,33)	p<0,086	
Feminino	2	9,09	20	90,91	22	1,00		
Total	10	20	40	80	50			

Teste não-paramétrico de Fisher.

Tabela 3. Distribuição do resultado da sonda HPV de amplo espectro segundo a raça.

Raça	Amplo				Total	RP	IC _{95%}	p-valor do χ^2
	Positivo		Negativo					
	nº	%	nº	%				
Branca	7	17,95	32	82,05	39	1,86 (0,5-6,9)	p<0,344	
Feminino	2	33,33	4	66,67	6	1,00		
Total	9	20	36	80	45			

Teste não-paramétrico de Fisher.

Tabela 4. Distribuição do resultado da sonda HPV de amplo espectro segundo a idade.

Idade (décadas)	Amplo				Total	RP	IC _{95%}	p-valor do χ^2
	Positivo		Negativo					
	nº	%	nº	%				
1ª e 2ª	1	16,67	5	83,33	6	2,9 (0,41-20,7)	p<0,650	
3ª, 4ª e 5ª	7	29,17	17	70,83	24			
6ª e 7ª	1	10	9	90	10	1,00		
Total	9	22,50	31	77,50	40			

Teste não-paramétrico de Fisher.

DISCUSSÃO

A hibridização *in situ* foi o método escolhido para detecção do HPV por inúmeras razões, mas, principalmente, pela possibilidade de estudo retrospectivo de biópsias, pois permite a detecção, subtipagem e localização do HPV em tecidos parafinados disponíveis em arquivos de patologia cirúrgica¹⁷⁻¹⁸.

O DNA do HPV foi detectado em 20% (10 / 50) dos casos, o que poderia indicar uma baixa prevalência do HPV na população estudada, porém, dentro da média encontrada na literatura, em que os valores para positividade variam de 13 a 100% para estas lesões orais^{17,19}. Entretanto, deficiências pertinentes à técnica devem ser levadas em consideração ao se fazer tal análise. A maioria dos estudos utiliza técnicas de reação da polimerase em cadeia, combinada ou não a outras técnicas, para detectar DNA do HPV em tecidos com diferentes formas de conservação e armazenamento. A razão para tal é que a técnica de reação da polimerase em cadeia é o método mais sensível entre os disponíveis para a identificação do HPV e é, em teoria, mais confiável e com menor risco de resultados falso-negativos. Entretanto, vários estudos que utilizaram a reação da polimerase em cadeia para pesquisar o HPV em lesões de papiloma, condiloma e verrugas orais encontraram também prevalências muito baixas^{15,19}.

Os baixos índices de HPV encontrados neste estudo poderiam ainda ser justificados pelo fato de que, em lesões benignas, o HPV está presente em um baixo número de cópias e, em sua maioria, na forma episossomal e não integrada ao DNA genômico. O DNA episossomal pode estar sujeito a uma maior degradação e perda durante o processamento do material, quando comparado ao DNA do vírus integrado ao DNA do hospedeiro. A degradação excessiva pode influir nas retenções das seqüências de DNA durante a hibridização *in situ*, assim como na eficácia da técnica, justificando assim a menor sensibilidade desta em amostras de tecidos parafinados.

O HPV parece estar relacionado com o estado de imunossupressão do hospedeiro¹⁹⁻²⁰, fato encontrado neste estudo, em que dois casos correspondiam a pacientes HIV positivos. A associação de dados clínicos como aspecto da lesão e estado imunológico do paciente pode ser indicativa para conclusão de um diagnóstico de condiloma acuminado, mesmo quando as reações de hibridização forem negativas. Pôde-se observar que nos casos de condiloma positivos para a reação de hibridização *in situ* os pacientes apresentavam aspectos clínicos que favoreciam o diagnóstico de lesão de origem por HPV, uma vez que três dos casos apresentavam história de lesões múltiplas e, em dois casos, os pacientes eram HIV positivos. Sabe-se que o condiloma acuminado oral é uma doença sexualmente transmissível^{2,5,20} e a auto-inoculação é considerada um importante fator relacionado. Este fato pôde ser observado em três (3/18) dos casos estudados; em dois deles os pacientes apresentavam outras lesões em diferentes sítios bucais e, no terceiro, o paciente tinha

história de lesões de condiloma na região genital. Nestes casos, a associação dos dados clínicos, histológicos e o resultado positivo da reação de hibridização *in situ* permitem concluir o diagnóstico de condiloma acuminado. Nos condilomas acuminados, alguns tipos de HPV de alto risco têm sido encontrados^{15,20}, incluindo HPV16, 18, 31 e 33. Este achado é mais comum nas lesões de pacientes HIV positivos, fato observado neste estudo, em que os dois casos positivos para as sondas HPV 16/18 e HPV 31/33, simultaneamente e nas mesmas células, correspondiam a pacientes HIV positivos.

Para as lesões de papiloma, encontrou-se uma positividade para o HPV abaixo do esperado, visto que muitos autores definem a lesão como de origem viral. Apenas três dos 20 casos (15%) foram positivos. Outros estudos que também utilizaram a hibridização *in situ* mostraram resultados que variavam de 40 a 80%^{2,12,21-22}. A baixa positividade para as lesões de papiloma encontrada neste estudo, assim como mostra a literatura^{1,19}, pode ter inúmeras justificativas, como o fato de células positivas terem sido perdidas em biópsias pequenas, ou um baixo número de cópias do DNA do HPV nestas lesões, ou ainda a hipótese de outra etiologia que não a viral. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o papiloma ainda é considerado a contraparte oral das lesões de verruga vulgar de pele, que poderia ser transmitida horizontalmente ou por auto-inoculação⁶.

Um fato a ser considerado é que a similaridade clínica e histológica entre as lesões de papiloma e condiloma acuminado poderia ser responsável por erros na real frequência e prevalência destas lesões⁶. Alguns autores chegam a considerar a diferença entre as lesões de papiloma e condiloma acuminado um fato puramente acadêmico, ou ainda sugerem que, se os HPVs 6 e 11 forem detectados na lesão, estas devem ser chamadas condiloma acuminado, desconsiderando-se nestes casos o diagnóstico de papiloma²³. Consideraram-se aqui características histológicas distintas que permitiram diferenciar as duas lesões, por acreditar que o diagnóstico não deve ser feito com base apenas no tipo de HPV encontrado, pois os HPVs 6/11, por exemplo, podem estar relacionados tanto com lesões de condiloma acuminado como com as de papiloma.

Analisando os resultados para as lesões de verruga, encontrou-se uma baixa positividade para a sonda de amplo espectro, presente apenas em 2/13 casos de verruga (15,38%), quando comparado aos resultados da literatura, nos quais os valores variam de 57% a 100% em verrugas orais^{2,21,23}. Este fato pode ser explicado por não terem sido

utilizadas as sondas específicas para os tipos de HPV mais comumente encontrados em lesões de verruga de pele, 2 e 57, tendo em vista a auto-inoculação como a principal causa de aparecimento destas lesões na cavidade oral²³.

Em concordância com Padayachee²³, conclui-se que o diagnóstico de verruga vulgar deve ser reservado para as lesões que apresentarem aspectos clínicos e histológicos de verruga associados à positividade para os subtipos HPV 2 e 57. No entanto, este fato - considerado como ideal - não foi obtido neste estudo, por não serem encontradas disponíveis no mercado as sondas específicas (HPV 2 e 57).

A determinação da técnica da reação da polimerase em cadeia como *gold standard* para detecção de HPV é indiscutível e muito bem fundamentada na literatura^{11-13,24-26}. Mas, como todas as outras, esta técnica também apresenta algumas limitações. Assim como para a reação da polimerase em cadeia ou para a hibridização *in situ*, a degradação excessiva sofrida pelo material quando submetido ao processamento para inclusão em parafina e fixação inadequada dificultariam a retenção das seqüências de DNA durante a técnica, interferindo assim na sensibilidade da mesma.

Neste estudo, a limitação do material impossibilitou a realização da técnica da reação da polimerase em cadeia associada à hibridização *in situ*, para melhor avaliar os casos negativos. Esta limitação de material também pode ser a razão pela qual alguns estudos, mesmo utilizando técnicas muito sensíveis, encontram prevalências baixas ou iguais a zero.

CONCLUSÃO

Foi encontrada uma baixa incidência do HPV na população estudada, porém, dentro da média encontrada na literatura. Não houve associação entre o tipo de HPV (HPV 6/11, HPV 16/18, HPV 31/33) e o diagnóstico das lesões de condiloma acuminado, papiloma oral e verruga vulgar, tendo em vista que os mesmos estiveram presentes nas três lesões estudadas. A associação dos dados clínicos e histológicos deve ser considerada como um meio que auxilia na conclusão do diagnóstico das lesões de papiloma, condiloma e verruga vulgar.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio concedido sob o n. 6555-5.

Colaboradores

C.A. LEITE realizou toda a parte laboratorial, revisão bibliográfica, análise e descrição dos resultados e conclusão do trabalho. O.G. SILVA participou da análise das

reações de hibridização *in situ*, da descrição dos resultados e fechamento da discussão do trabalho. P.M. RECHE participou da análise estatística dos dados, confecção das tabelas e descrição dos resultados. R. ACAY auxiliou na parte laboratorial e confecção das figuras. S.O.M. SOUSA orientou a pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Syrjänen K. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol.* 2003; 192(3): 123-8.
3. Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(2): 166-74.
4. Terai M, Takagi M. Human papillomavirus in the oral cavity. *Oral Med Pathol.* 2001; 6: 1-12.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
6. Costa LJ, Silveira FRX, Batista JM, Birman EG. Human papilloma virus: its association with epithelial proliferative lesions. *Braz Dent J.* 1994; 5(1): 5-10.
7. King MD, Reznik AD, O'Daniels CM, Larsen NM, Osterholt D, Blumberg M. Human papillomavirus-associated oral warts among human immunodeficiency virus-seropositive patients in the era of highly active antiretroviral therapy: an emerging infection. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(5): 641-8.
8. Lilly EA, Cameron JE, Shetty KV, Leigh JE, Hagers S, McNulty KM. Lack of evidence for local immune activity in oral hairy leukoplakia and oral wart lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(3): 154-62.
9. Lancellotti CLP, Levi JE, Silva MALG, Schwarzschild M, Nicolau SM. Diagnóstico laboratorial. In: Carvalho JJM, Okayakama N, Focchi J. I Consenso Brasileiro de HPV – Papillomavirus Humano. São Paulo: BG Cultural; 2000. p. 45-60.
10. Herrington CS. Demystified...*in situ* hybridisation. *Mol Pathol.* 1998; 51(1): 8-13.
11. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(8): 940-5.
12. Dabic MM, Hlupic L, Babic D, Jukic S, Seiwert S. Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification *in situ* hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch Med Res.* 2004; 35(6): 511-6.
13. Nuovo GJ. The surgical and cytopathology of viral infections: utility of immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and *in situ* polymerase chain reaction amplification. *Ann Diagn Pathol.* 2006; 10(2): 117-31.
14. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Benatti-Neto C, Oliveira MR, Soares CP. p16 (INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(10): 1291-7.
15. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006; 72(2): 272-82.
16. Neville BW, Damn DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral e maxilofacial. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
17. Lawton GM, Thomas SJ, Schonrock J, Monsour FN, Frazier IH. Human papillomavirus in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med.* 1992; 21(6): 265-9.
18. Nuovo GJ, Smith S, Lerner J, Comite S, Eliezi Y. Human papillomavirus segregation patterns in genital and non-genital warts in prepubertal children and adults. *Am J Clin Pathol.* 1991; 95(4): 467-72.
19. Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(5): 260-3.
20. Anderson Ka, Montiel DP, Miles L, Allen CA, Nuovo GJ. The histologic differentiation of oral condyloma acuminatum from its mimics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(4): 420-8.
21. Eversole LR, Laipis PJ, Merrell P, Choi E. Demonstration of human papillomavirus DNA in oral condyloma acuminatum. *J Oral Pathol.* 1987; 16(5): 266-72.
22. Syrjänen K, Syrjänen S. Papillomavirus infection in human disease. New York: Wiley; 2000. 615 p.
23. Padayachee A. Human papillomavirus (HPV) types 2 and 57 in oral verrucae demonstrated by *in situ* hybridization. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23(9): 412-7.
24. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based *in situ* hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol.* 2003; 3(1): 2.
25. Terai M, Takagi M, Matsukura T, Sata T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28(3): 137-40.
26. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological or contamination? *J Oral Pathol Méd.* 2006; 35(2): 86-90.

Recebido em: 10/4/2008
Aprovado em: 19/7/2008