



Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

ISSN: 1808-8694

revista@aborlccf.org.br

Associação Brasileira de
Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-
Facial
Brasil

Doria Xavier, Sandra; Bussoloti Filho, Ivo; Penteado Lancellotti, Carmem Lúcia
Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de
carcinoma espinocelular de cavidade oral eorofaringe: estudo preliminar
Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 71, núm. 4, julio-agosto, 2005, pp. 510-514
Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392437752019>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar

Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study

Sandra Doria Xavier¹, Ivo Bussoloti Filho²,
Carmem Lúcia Penteado Lancellotti³

Palavras-chave: carcinoma, papilomavírus, boca, orofaringe.
Key words: carcinoma, papillomavirus, mouth, oropharynx.

Resumo / Summary

O papilomavírus humano (HPV) é universalmente aceito como agente causal do câncer de colo uterino e, recentemente, vem se especulando sobre sua possível relação com câncer oral e de orofaringe. O carcinoma espinocelular (CEC) oral representa 90% de todos os tumores malignos que afetam a cavidade bucal. Estudos sobre a prevalência de HPV em pacientes com CEC variam de 0 a 100%. O efeito citopático viral mais conhecido é a coilocitose, considerado "critério maior" na infecção pelo HPV do ponto de vista histopatológico. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de achados sugestivos de HPV - coilocitose - em CEC oral e de orofaringe. **Forma de estudo:** coorte transversal. **Material e método:** Foram examinadas no microscópio 20 lâminas com o diagnóstico de CEC de cavidade oral ou orofaringe sendo que em 15 delas foi encontrada coilocitose, correspondendo a 75%. **Resultados:** Apesar de termos conhecimento que o método com maior sensibilidade atual para pesquisa de HPV ser a reação de polimerase em cadeia (PCR), iniciamos esta pesquisa com a investigação de coilocitose, o que é muito sugestivo de infecção por HPV. **Conclusão:** O estudo em questão trata-se de um projeto-piloto pois será dada continuidade a esta pesquisa através da realização de PCR a fim de confirmar a alta prevalência de infecção por HPV em CEC oral e de orofaringe.

Human papillomavirus (HPV) is considered to be an etiologic agent of cervical cancer and, recently its relation to oral and oropharyngeal cancer has also been investigated. Oral squamous cell carcinoma (SCC) represents 90% of all malignant tumors that affect the oral cavity. The prevalence of HPV in patients with SCC ranges from 0 to 100%. The most known viral cytopathic effect is koilocytosis, considered to be a major characteristic of HPV infection. **Aim:** The aim of this study was to verify the prevalence of some peculiar characteristics of HPV - koilocytosis - in oral and oropharyngeal SCC. **Study design:** transversal cohort. **Material and method:** Twenty slides with oral and/or oropharyngeal SCC were examined under microscopy. **Results:** in 15 of them, koilocytosis was found, amounting to 75%. Although we know that polymerase chain reaction (PCR) is the method with the best sensitivity for HPV detection, we began this research looking for koilocytosis, which is highly suggestive of HPV infection. **Conclusion:** This study is a trial project and we will continue this research with PCR measures to confirm this high prevalence of HPV infection in oral and oropharyngeal SCC.

¹ Médica Otorrinolaringologista, mestrandra.

² Doutor em Otorrinolaringologia, Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

³ Doutora em Patologia, Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Irmãndade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Endereço para correspondência: Rua Nazaré Paulista, 163 bloco 2 ap. 94 B Vila Madalena São Paulo SP 05448-000.

Tel. (0xx11) 3672-6457 - 9972-0009 - E-mail: ssandria@yahoo.com.br

Artigo recebido em 24 de março de 2005. Artigo aceito em 13 de junho de 2005.

INTRODUÇÃO

O HPV é um vírus de replicação intranuclear, de tamanho pequeno, com cerca de 50 nm de diâmetro¹. Pode infectar mucosas e superfícies cutâneas em quase todas as espécies vertebrais². Até o momento foram identificados cerca de 70 tipos de HPVs³ classificados de acordo com a distribuição dos ácidos nucléicos no genoma viral, sendo os subtipos 1, 2, 4, 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32 e 57 encontrados na cavidade oral⁴.

Pesquisa extensa associou alguns subtipos de HPV a lesões malignas e pré-malignas de cérvico uterino, vulva, pênis, conjuntiva e trato aerodigestivo superior⁵. O HPV é universalmente aceito como agente causal do câncer de colo uterino e, em anos recentes vem se especulando sobre sua possível relação com câncer de cavidade oral e orofaringe.

O efeito citopático viral mais conhecido é a coilocitose, considerado “critério maior” na infecção pelo HPV do ponto de vista histopatológico, sendo que a atipia coilocítica consiste em atipia nuclear e vacuolização perinuclear⁶.

Atualmente, dispõem-se de métodos de biologia molecular para o estudo do HPV, como hibridização *in situ*, captura híbrida e PCR, que permitem não só maior sensibilidade diagnóstica como também a tipagem do HPV, porém são exames de custo muito mais elevado se comparado com a detecção de coilocitose em lâminas coradas por hematoxilina-eosina.

HPV e Carcinoma Espinocelular Oral (CEC)

O carcinoma de células escamosas oral ou também chamado carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC) oral representa 90% de todos os tumores malignos que afetam a cavidade bucal⁷. No desenvolvimento do câncer oral, os fatores mais comumente associados são fumo, álcool, sífilis, deficiências nutricionais, sol, traumatismo, má higiene e irritação por bordas pontiagudas de dentes ou dentaduras⁸. Além dessas, os vírus vêm sendo amplamente estudados como possíveis agentes carcinogênicos. Sýrjanen et al.⁹ sugeriram o envolvimento do HPV com o câncer bucal, quando associaram as alterações celulares encontradas em lesões malignas e pré-malignas da boca às mesmas que ocorriam no câncer de cérvico uterina. A infecção pelo papiloma vírus humano é identificado como causa de mais de 95% dos carcinomas do colo uterino e em grande proporção em outros carcinomas genitais¹⁰.

O uso do tabaco e álcool são fatores de risco bem estabelecidos para câncer oral, entretanto uma pequena proporção (15-20%) dos pacientes não têm história de tabagismo e etilismo, sugerindo a presença de outros fatores de risco¹¹ como o HPV, porém seu papel ainda não foi bem definido. Um achado intrigante é a redução de aproximadamente 40% no risco de óbito de pacientes com tumores HPV positivos.

O HPV 16 é o tipo mais comum associado a câncer

oral e de colo de útero^{12,13} enquanto os tipos 6 e 11 são os mais freqüentemente encontrados em lesões benignas e pré-malignas e raramente nas lesões neoplásicas da cabeça e pescoço¹⁴.

A importância da infecção pelo HPV na carcinogênese oral é suportada pela capacidade dos HPVs de alto risco para imortalizar ceratinócitos orais *in vitro*¹⁵.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é determinar a prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano - coilocitose - em CEC de cavidade oral e orofaringe através do estudo histológico dessas lesões.

MATERIAL E MÉTODO

Foram examinadas por microscopia óptica 20 casos com diagnóstico de CEC de cavidade oral e orofaringe na procura de sinais sugestivos de infecção pelo HPV em lâminas coradas por hematoxilina-eosina.

Paralelamente, foram pesquisados dados de prontuário dos 20 casos, como pode ser visto na Tabela 1.

RESULTADOS

Foi encontrada coilocitose em 75% dos casos (15/20), o que denominamos casos coilocitose positivos (C+).

No levantamento dos prontuários, foi encontrado que 19 pacientes eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino, com idade variando de 42 a 86 com média de 58,9 anos; quinze da raça branca, três pardos e dois negros. Dentre os pacientes C+, a idade variou de 47 a 80 anos, com média de 57,9 anos e dentre os C- a idade variou de 42 a 86 anos, com média de 61,8 anos.

Onze pacientes eram tabagistas (55%) e seis eram etilistas (30%), sendo que em 6 pacientes (30%) - 5 C+ e 1 C- não havia relato no prontuário sobre tabagismo e etilismo. Dentre os pacientes C+, 60% eram tabagistas e 40% eram etilistas, enquanto dentre os C-, 40% eram tabagistas e nenhum etilista, como pode ser visto na Tabela 2.

A localização do tumor era variável, sendo a maioria no palato (35%) - sendo 20% em palato mole e 15% em palato duro - seguido de assoalho da cavidade oral (25%), orofaringe (20%), língua (10%), gengiva (5%) e mucosa jugal (5%). Dentre os pacientes C+, as localizações mais freqüentes foram palato e assoalho da cavidade oral, ambas com 27% enquanto dentre os C- a região mais acometida foi palatal (60%).

Quanto ao aspecto clínico no momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresentavam lesão infiltrativa ulcerada (60%), e em estádio avançado - T4 (50%), sendo que em 7 pacientes (35%) - 5 C+ e 2 C- - não havia relato no prontuário sobre estádio clínico. Dentre os pacientes C+

66% apresentavam lesão infiltrativa ulcerada e 54% em estádio avançado enquanto dentre os C- 40% apresentavam lesão infiltrativa ulcerada e 40% em estádio avançado.

DISCUSSÃO

No presente estudo, evidenciamos coilocitose em 15 das 20 lâminas estudadas, correspondendo a 75% dos casos.

A coilocitose, inicialmente descrita por Leopoldo Koss et al. em 1956¹⁶, consiste em células com núcleos picnóticos, contornados por extensos halos claros com volume geralmente superior ao citoplasma, visto em lâminas sob microscopia óptica, como pode ser visto na Figura 1. Segundo alguns autores^{17,18}, a coilocitose constitui sinal patognomônico de infecção por HPV, servindo como base para os estudos de biologia molecular.

Alguns trabalhos na literatura mostram que a freqüência de HPV em carcinoma oral varia de 0 a 100%^{13,19} enquanto outros autores relatam ser de 18 a 100%^{12,14}. A média de 25% foi estimada por Garlick²⁰ em sua revisão sobre o assunto. Como se pode perceber, há extrema variabilidade de positividade, o que pode ser devido a diferentes tamanhos de amostra ou também por utilizarem métodos com variável sensibilidade e especificidade.

Herrero et al.²¹ evidenciaram DNA de HPV em 3,9% de 766 biópsias de câncer de cavidade oral e 18,3% de 142 biópsias de câncer de orofaringe, através de estudo por PCR. Klussmann et al.²² encontraram 18% de DNA de HPV em biópsias de câncer de cavidade oral, 8% em câncer de

nasofaringe, 25% em câncer de hipofaringe e 45% em câncer de orofaringe e particularmente em carcinomas de tonsila (58%). Ritchie et al.²³ detectaram HPV em 21% dos tumores de cavidade oral e orofaringe, sendo 83% deles HPV-16. Ha et al.²⁴ encontraram 0,98% de DNA de HPV em lesões pré-malignas e somente 2,9% em lesões malignas da cavidade oral.

Niv et al.²⁵ realizaram estudo no qual investigaram a presença de HPV em carcinoma de cavidade oral e encontraram 17,3% de positividade, sendo que em todas elas a localização do tumor era em pilar anterior amigdaliano. Outros estudos, as localizações tumorais mais freqüentes nas quais foram encontrados indícios de HPV foram mucosa jugal e palatal (40-50%)²⁶. No presente estudo, as localizações mais freqüentes foram palato e assoalho da cavidade oral, ambas com 27% de prevalência.

Os carcinomas HPV positivos parecem ser uma entidade distinta (acometem mais células basais e tem um componente inflamatório menor), com biologia distinta (menor mutação de p53), fatores de risco distintos (menor associação com tabaco e álcool) e um curso clínico distinto (maior sobrevida)¹¹. No entanto, no presente estudo não observamos menor associação com tabaco e álcool, pelo contrário, encontramos maior porcentagem de etilistas e tabagistas entre o grupo C+.

Cruz et al.²⁷ verificaram que pacientes com menos de 60 anos com CEC oral tem oito vezes mais risco de estar infectado pelo HPV do que pessoas com mais de 60 anos. Em seu estudo, homens tinham mais positividade para HPV

Tabela 1. Relação dos pacientes com CEC oral ou de orofaringe

Iniciais	Idade	Sexo	Raça	Fumo	Álcool	Local	Estádio	Lesão	C
F.V.S.	86	M	B	?	?	Mucosa jugal	?	Úlcera	-
A.S.	69	M	B	-	-	Palato duro	T4N1Mx	Infiltrativa.ulcerada	-
M.H.M.	42	M	P	-	-	Palato duro	T4NoMo	Infiltrativa.ulcerada	-
D.C.	51	M	B	+	-	Assoalho	?	Infiltrativa	-
C.A.S.	61	M	B	+	-	Palato mole	T1NoMo	Úlcera	-
I.D.	48	M	B	-	-	gengiva	?	Reabsorção óssea	+
C.M.F.	55	M	B	?	?	Palato mole	T4N2cMx	Infiltrativa ulcerada	+
J.Z.T.	58	M	B	+	+	assoalho	?	Infiltrativa ulcerada	+
R.A.S.	71	M	B	?	?	Assoalho	?	Infiltrativa	+
A.C.P.	63	M	B	+	+	Orofaringe e laringe	T4N2cMx	Infiltrativa ulcerada	+
G.A.Z.	47	M	B	+	+	Palato mole	TxN3Mx	Infiltrativa ulcerada	+
J.C.G.M	63	M	B	+	+	Palato mole	?	Infiltrativa ulcerada	+
T.C.M.	56	M	B	?	?	Orofaringe	T4N2Mo	Infiltrativa ulcerada	+
S.B.C.	56	M	B	?	?	Palato duro	?	Infiltrativa ulcerada	+
J.T.S.	80	M	N	+	+	Língua	T3N1Mx	Infiltrativa ulcerada	+
M.E.V.	55	F	P	+	-	Língua	T4N1Mx	Infiltrativa ulcerada	+
R.A.A.	64	M	N	+	-	Orofaringe e base língua	T4N2cMx	Vegetante	+
R.D.O.	53	M	B	+	-	Orofaringe	T4NoMo	?	+
A.G.V.	53	M	B	+	+	Assoalho	T4N2cMo	Exofítica ulcerada	+
E.F.F.	47	M	P	?	?	Língua e assoalho	T4N2cMo	Infiltrativa ulcerada	+

C: coilocitose; T: tumor, N: linfonodo, M: metástase (classificação TNM); ?: não relatado no prontuário; M: masculino, F: feminino; B: branco, P: pardo, N: negro; +: presente, -: ausente.

do que mulheres, mas não encontraram associação entre infecção por HPV e local de tumor, estágio clínico no diagnóstico ou tabagismo e etilismo. No nosso levantamento, não encontramos diferença significativa de faixa etária entre os grupos C+ e C-.

Klussmann et al.²⁸ perceberam diferença estatisticamente significante entre a prevalência de HPV em tumor de orofaringe (45%), especialmente em tonsilas palatinas (58%) em relação a outras regiões da cavidade oral (7 a 25%).

Alguns autores^{11,28} acreditam que os carcinomas de tonsila palatina HPV positivos componham uma entidade tumoral à parte. Klussmann et al.²⁸ observaram que esses pacientes apresentaram exposição estatisticamente menor aos fatores de risco sabidamente conhecidos como o cigarro e álcool, além de também terem encontrado correlação estatisticamente significante entre HPV e baixo grau de diferenciação dos tumores, contradizendo os achados dos autores anteriormente citados.

Miller e Johnstone²⁹, em meta-análise de 1982-1997 concluíram que o HPV é um fator de risco independente e de suma importância no CEC, sendo que os seus resultados

indicam que a detecção do HPV é duas a três vezes mais comum em lesões pré-malignas orais e 4,7 vezes mais comum em CEC, quando comparado com a mucosa oral normal.

Brandwein et al.³⁰ observaram que não há associação estatística entre HPV e estádio TNM e clínico ou grau de diferenciação do tumor. Em seus estudos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos HPV negativos e positivos a respeito do intervalo livre de doença e tempo de sobrevida.

Apesar de termos conhecimento que o melhor método atual para pesquisa de HPV é o PCR, iniciamos esta pesquisa com a investigação de coilocitose em lâminas coradas por hematoxilina-eosina o que é muito sugestivo de infecção por HPV. O estudo em questão trata-se de um projeto piloto pois será dada continuidade a esta pesquisa através da realização de PCR em todas as lâminas já examinadas a fim de confirmar a alta prevalência de infecção por HPV em CEC oral. O estudo histológico, por si só, pode sugerir a presença de HPV, sendo um método de *screening* de lesões associadas ao HPV. É um método de grande utilidade em centros que não dispõem de métodos de diagnóstico sofisticados de biologia molecular.

CONCLUSÃO

Através do exame criterioso dos anatomo-patológico de CEC de cavidade oral e orofaringe, observamos alta prevalência de coilocitose - 75% -, o que sugere possivelmente alta prevalência de HPV nesses tumores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sarruf MBJM, Dias EP. Avaliação citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). J Bras Doenças Sex Trans 1997; 9(2): 4-18.
2. Howley PM, Schlegel R. The human papillomaviruses. An overview. (Review). Am J Med 1988; 85(2A): 155-8.
3. Oliveira LHS. Virologia Humana. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1994. p 311.
4. Kellokoski JK, Syrjanen SM, Syrjanen KJY, Kiloski M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. J Oral Pathol Med 1990; 19: 142-8.
5. Pfister H, Fuchs PG, Volcker HE. Human papillomavirus DNA in conjunctival papilloma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1985; 223: 164-7.
6. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Patologia Estrutural e Funcional. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 1996. p. 937.
7. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 1998. p. 705.
8. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Tratado de Patologia Bucal. 2º ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1985.
9. Syrjanen K, Gissman L, Koss K. Papillomaviruses and human disease. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer; 1987. p. 104, 37.
10. Rosenberg SK, Greenberg MD, Reid R. Sexually transmitted papilloma viral infection in men. Obstet Gynecol Clin North Am 1987; 14: 495-512.

Tabela 2. Tabagismo e etilismo entre os pacientes coilocitose positivos e negativos

	C + (n=15)	C -(n=5)
Tabagismo (n=11)	60%	40%
Etilismo (n=6)	40%	0%
Local + freqüente	Palato (27%) e assoalho (27%)	Palato (60%)

C+: coilocitose

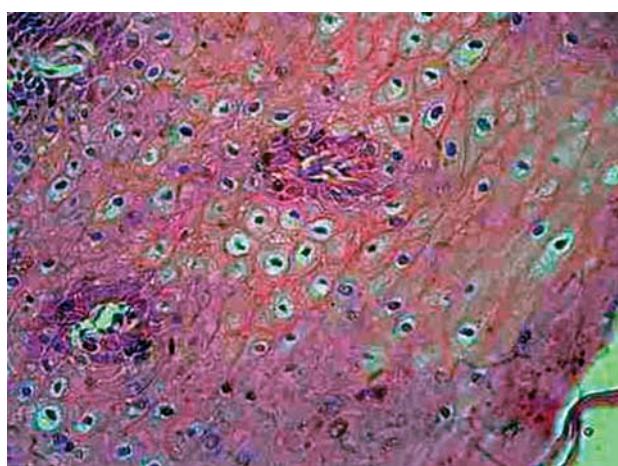


Figura 1. Lâmina corada por hematoxilina-eosina mostrando coilocitose: células com halos picnóticos, contornados por extensos halos claros com volume geralmente superior ao citoplasma.

-
11. Gillison ML, Koch WM, Capone RB et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *JNCI* 2000; 92(9): 709-20.
12. Yeudall WA. Human papillomavirus and oral neoplasia. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1992; 28B: 61-6.
13. Woods K, Shillitoe E, Spitz M, Schantz S, Adler-Stortz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 101-8.
14. Snijders PJ, Scholes AG, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA et al. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 1996; 66: 464-9.
15. Sugerman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997; 3: 130-47.
16. 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.
17. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutilinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418-24.
18. Premoli-de-Percoco G, Galindo I, Ramirez JL, Perrone M, Rivera H. Detection of human papillomavirus-related oral verruca vulgaris among Venezuelans. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 113-6.
19. Dekmezian RH, Batsakis JG, Goepfert H. In situ hybridization of papillomavirus DNA in head and neck squamous cell carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1987; 113: 819-21.
20. Garlick JA, Taichman IB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 386-95.
21. Herrero R et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23): 1772-83.
22. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 2003 (Berl); 192(3): 129-32.
23. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003; 104(3): 336-44.
24. Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, Califano JA. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5): 1203-9.
25. Niv A, Sion-Vardi N, Gatot A, Nash M, Fliss DM. Identification and typing of human papillomavirus (HPV) in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Laryngol Otol* 2000; 114: 41-6.
26. Shindoh M, Chiba I, Yasuda M. et al. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p54 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer* 1995; 76: 1513-21.
27. Cruz IBF, Snijders PJF, Steenbergen RDM, et al. Age- dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996; 32B: 55-62.
28. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Weiland U, Dries V, Kolligs J, Junghuhns M et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001; 92: 2875-84.
29. 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: 622-35.
30. Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ, et al. HPV detection using "hot start" polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. (Review). *Mod Pathol* 1994; 7: 720-7.