

Taís Alves dos Reis

**Detecção de HPV (Papiloma Vírus Humano) em
Carcinoma Epidermóide Bucal: Estudo Caso-
Controle**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia, Área de
Concentração em Cirurgia e Traumatologia
Buco-Maxilo-Facial

Uberlândia, 2009

Taís Alves dos Reis

Detecção de HPV (Papiloma Vírus Humano) em Carcinoma Epidermóide Bucal: Estudo Caso- Controle

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco –Maxilo- Facial

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Profa. Dra. Suzana C. O. Machado de Sousa

Uberlândia

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R375d Reis, Taís Alves dos, 1979-

Detecção de HPV (Papiloma vírus humano) em carcinoma epidermóide bucal : estudo caso-controle / Taís Alves dos Reis. - 2009.

105 f. : il.

Orientador: Adriano Mota Loyola.

Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Boca - Câncer - Teses. 2. Cabeça - Câncer - Teses. 3. Pescoço - Câncer - Teses. 3. Vírus do papiloma - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU:

616.31-006.6

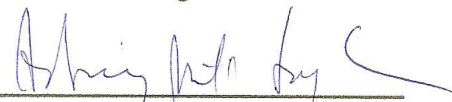
Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE MESTRADO DA
CD TAIS ALVES DOS REIS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.**

Às nove horas do dia quatorze de agosto do ano de dois mil e nove, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia/UFU, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata TAIS ALVES DOS REIS com o título: ***Deteção de HPV (Papilomavírus Humano), em carcinoma epidermóide bucal: Estudo caso-controle.*** O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

Uberlândia 14 de agosto 2009



Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

APROVADA.

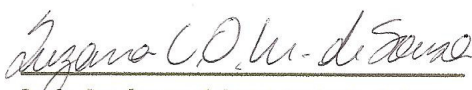
Aprovado/Reprovado



Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

APROVADO.

Aprovado/Reprovado



Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa
Titulação: Doutora
Universidade de São Paulo - USP

Aprovada

Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, em especial ao meu noivo Marcelo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por não desistir de mim. Diante da Sua infinita misericórdia dobro os meus joelhos.

Aos meus pais Evanir e Maria Eunice, pelo amor e apoio incondicionais, mesmo conscientes de minhas fraquezas e defeitos. O meu agradecimento será sempre pequeno diante do amor e do exemplo de vocês.

Ao meu noivo Marcelo pela compreensão, pelo apoio e acima de tudo pelo amor e pela forma que você me ensinou a superar as dificuldades. Eu sou uma pessoa melhor porque você está ao meu lado.

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Nina e afilhado Kauê, por estarem ao meu lado, mesmo nos dias mais turbulentos. Muito obrigada.

Aos meus familiares e amigos. Vocês são o meu alicerce.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Mota Loyola e meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e ao colaborador Antônio Ignácio de Loyola Filho por me ensinarem a dedicação à pesquisa. Obrigada pelos exemplos, ensinamentos e por acreditarem que tudo isso poderia dar certo.

Aos professores e colegas da Área de Patologia Bucal que de uma forma ou de outra colaboraram para que este trabalho fosse concluído. No meio das dificuldades sempre encontrei apoio de vocês. Que todos colham o sucesso que plantam todos os dias.

Aos membros da equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Vocês, como médicos, não se contentam em tratar a doença, mas sim o doente. Com toda certeza, aprendi muito.

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial a Juliana, pela paciência e dedicação dispensadas a este trabalho.

Aos colegas de mestrado, em especial Marília e Marcello Roter. Vocês estiveram sempre presentes. Obrigada pela amizade que eu sempre vou levar comigo.

**O maior dom que você vai receber na vida é o de acreditar em
si mesmo. Guarde-o com todas as suas forças, pois ele é a
única coisa que será
sempre realmente sua.**

Tiffany L. Rowe

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de abreviaturas e siglas

AJCC – Junta Americana de Combate ao Câncer (do inglês, *American Joint Committee on Câncer*).

Arg – Arginina.

CDKs – Quinases Dependentes de Ciclina (do inglês, *Cyclin-Dependent protein Kinase*).

CEB – Carcinoma Epidermóide Bucal.

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa.

°C – Graus Celsius.

DAP-kinases – Proteína associada ao controle da morte celular (do inglês, *Death-Associated Protein Kinase*).

DNA – Ácido esoxirribonucléico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*).

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfato (do inglês, *deoxyribonucleic triphosphate*).

E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7 – genes iniciais do HPV (do inglês, *Early*).

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético (do inglês, *Ethylene-diamine tetraacetic acid*).

EGF – Fator de Crescimento Epidermal (do inglês, *Epidermal Growth Factor*).

ELISA – Ensaio imunoenzimático que permite a detecção de anticorpo (do inglês, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*).

gmax – Força centrífuga relativa.

HPV – Papiloma Vírus Humano (do inglês, *Human Papillomavirus*).

HSPGs – Glicoproteínas Heparan Sulfato (do inglês, *heparan sulphate proteoglycans*).

INCA- MS – Instituto Nacional do câncer – Ministério da Saúde.

L1 e L2 – genes tardios do HPV (do inglês, *Late*).

LCR – Região de controle longa (do inglês, *long control region*).

RNA – Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*).

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro (do inglês, *mesenger ribonucleic acid*).

ORF- Estruturas do DNA abertas para leituras (do inglês, *open reading frames*).

µL – Microlitro

ng – nanogramas

PCR – Reação em Cadeia Polimerase (do inglês, *polimerase chain reaction*).

Nested-PCR – Reação em Cadeia Polimerase tipo *Nested* (do inglês, *Nested polymerase chain reaction*).

PDEGF – Fator de Crescimento Endotelial Derivado de Plaquetas (do inglês, *Platelet-Derived Endothelial Growth Factor*).

pH – Potencial hidrogeniônico

Pro - Prolina

rpm – Rotações por minuto

Taq – Polimerase de DNA do *Thermus aquaticus*

TLN – Tampão de Lise Celular

TNM - Tamanho/ Linfonodo/ Metástase

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UICC- (União Internacional de Combate ao Câncer (do inglês, International Union Against Cancer).

V – volts

VLPs – Partículas semelhantes às do vírus (do inglês, *virus like particles*).

RESUMO

RESUMO

O câncer bucal é uma das neoplasias malignas mais comuns na região de cabeça e pescoço, possuindo alta incidência na população, sendo responsável por altas taxas de óbitos. Exposição aos produtos do fumo e álcool tem sido considerada a maior causa de seu desenvolvimento. Todavia, algumas evidências apontam para o fato de que o Papilomavirus Humano (HPV) pode atuar na sua gênese e progressão. O objetivo deste trabalho foi verificar a frequência e os tipos de HPV em casos de carcinomas epidermóides bucais (CEB) e verificar sua associação com a doença. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, a partir de 50 casos de CEB diagnosticados e tratados na Universidade Federal de Uberlândia, e um grupo controle de 150 pacientes sem câncer, pareados a partir de sexo e idade dos pacientes casos. Para identificação e avaliação da frequência do HPV nos diferentes grupos, utilizou-se a técnica de *Nested-PCR* (Reação em Cadeia Polimerase, tipo *Nested*) para identificação e tipagem do DNA viral. A reação foi desenvolvida com a utilização *primers* degenerados MY09/MY11, seguidos da tipagem dos HPV por meio de *primers* de tipagem combinados em oito kits *multiplex*, possibilitando a identificação e tipagem de 40 tipos de HPV. Os resultados mostraram que a amostra de CEB apresentou uma relação homem:mulher de 2,8:1, com um pico de casos para pacientes na sétima década de vida. A frequência do HPV nos casos foi de 22% (11 amostras) e de 9,3% nos controles (14 amostras). Os tipos identificados nos casos de CEB foram 16 e 31 (alto risco) e 6, 44, 54 e 55 (baixo risco); nos pacientes do grupo controle foram encontrados os tipos 33, 35, 45, 52, 62, 66 (alto risco) e 42 (baixo risco). A análise univariada mostrou associação somente entre HPV, exposição ao fumo e ao álcool e o câncer bucal. Todavia, a regressão logística evidenciou uma associação direta entre exposição ao álcool e o câncer. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre idade, sexo, exposição aos produtos de fumo e álcool, localização das lesões (orofaringe e outras), estadiamento dos CEB e a presença de HPV. Estes dados permitiram concluir que o desenvolvimento do câncer bucal não parece estar associado à presença do HPV.

ABSTRACT

ABSTRACT

Oral cancer is one of the most common neoplasia in head and neck region, presenting high incidence in population and being responsible for high rates of deaths. Exposure to the products of tobacco and alcohol has been considered the major cause for the development of this disease. Though, some evidences indicate that Human Papillomavirus (HPV) can act in its genesis and progression. The objective of this work was to verify the frequency and the types of HPV in cases of oral squamous cell carcinomas and to verify its association with the disease. We accomplished a case-control study using 50 samples of squamous cell carcinomas that were diagnosed and treated in Federal University of Uberlândia, and a control group of 150 patients without cancer, matching from sex and age of the case patients. For identification and evaluation of the frequency of HPV in the different groups, the technique of *Nested-PCR* was used (Polimerase Chain Reaction, type *Nested*) for identification and typing of viral DNA. The reaction was developed using consensus *primers* MY09/MY11, following by the HPV typing through *primers* combined in eight *multiplex* kits, making possible the identification and typing of 40 types of HPV. The results showed that the sample of squamous cell carcinoma presented a relationship man:homan of 2,8:1, with a pick of cases for patients in the seventh decade of life. The frequency of HPV in cases was 22,0% (11 samples) and 9,3% in the controls (14 samples). The identified types in cases of squamous cell carcinoma were 16 and 31 (high risk) and 6, 44, 54 and 55 (low risk); in the patients of the control group were found types 33, 35, 45, 52, 62, 66 (high risk) and 42 (low risk). The univariate analysis showed association only among oral cancer and HPV and exposure to tobacco and alcohol. Though, the logistic regression evidenced a direct association among exposure to alcohol and cancer. No association was observed among age, sex, exposure to the products of tobacco and alcohol, location of the lesions (oropharynx and other), clinical stage of squamous cell carcinoma and the presence of HPV. These data allowed the conclusion that the development of oral cancer doesn't seem to be associated to the presence of HPV.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide bucal (CEB) é uma das neoplasias malignas mais comuns da região de cabeça e pescoço, perfazendo 90% dos tumores malignos que acometem os tecidos bucais e aproximadamente 8% dos cânceres humanos. Está situado entre as 10 neoplasias que mais freqüentemente acometem homens e mulheres no mundo, estando entre os seis tipos mais diagnosticados e entre as 20 maiores causas de morte na população brasileira (Brasil/MS, 2008).

Diante desta perspectiva, o que chama atenção é o padrão de diagnóstico encontrado para o câncer bucal que, em geral, é tardio. Mais de 50% destas lesões são identificadas em estágios III e IV, cujos prognósticos alcançam taxas de sobrevida inferiores a 40%, associadas a tratamentos de alto custo e mutilantes. A propósito, a falta de diagnóstico precoce pelo profissional e o desconhecimento dos principais fatores de risco e sinais de alerta pela população têm contribuído de forma decisiva para o pobre prognóstico da doença.

O conhecimento objetivo sobre o dano causado pelo câncer à população, a existência de fatores de risco determinados bem como de procedimentos de prevenção e tratamento eficazes para a doença, colocam o câncer bucal como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo.

O CEB é uma doença que está intimamente relacionada aos hábitos dos pacientes. Dentre os principais fatores de risco associados à doença, assume papel de destaque a exposição aos produtos do fumo e do álcool, radiação actínica, consumo de chimarrão – especialmente no Sul do Brasil, dieta e imunodeficiências.

Recentemente, maior atenção tem sido dada à importância de agentes infecciosos na gênese do CEB. Neste contexto, o papilomavírus humano tem se destacado, especialmente em função da sua freqüente associação com o desenvolvimento do câncer ano-genital.

A associação entre os tipos 16 e 18 do HPV e o câncer cervical na mulher é bem conhecida, mas ainda não foi estabelecida uma relação causal definitiva entre a presença do HPV e o desenvolvimento de CEB. Parte das evidências desta associação recai sobre a associação causal do HPV com diferentes tipos de lesões benignas bucais como papiloma, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal. Alguns mecanismos desenvolvidos pelo vírus que induzem o descontrole da proliferação celular identificados na gênese do câncer cervical poderiam também atuar na transformação maligna do epitélio bucal e orofaríngeo. A propósito, muitas semelhanças estruturais têm sido identificadas entre os epitélios destes sítios anatômicos. Ademais, outras evidências apontam para a interferência viral na progressão e no comportamento biológico dos tumores. Neste sentido, identificar a associação do HPV com a carcinogênese bucal poderia lançar novas perspectivas para medidas de prevenção do câncer, a partir de protocolos de proteção específica da contaminação pelo vírus, mudanças em protocolos terapêuticos e melhoria no prognóstico da doença.

Várias abordagens têm sido realizadas para identificar a associação entre o HPV e CEB. Todavia, a prevalência do vírus nestas lesões tem sido observada em índices variáveis, indo de ausente até 100% de frequência. Esta discordância de resultados limita o entendimento da relação entre o vírus e o câncer, e tem sido atribuída a fatores tais como natureza da amostra, variações geográficas na sua procedência, diferentes desenhos de estudo, bem como a metodologias empregadas, apresentando sensibilidade e especificidade variáveis na evidência da infecção viral.

Estudos publicados a partir de amostras da população brasileira ainda são escassos, e seus resultados ainda pouco consistentes, refletem de forma geral as limitações apontadas no parágrafo precedente. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo identificar a frequência e os tipos de HPV em CEB e sua associação com a doença, a partir de um estudo caso-controle utilizando casos de CEB diagnosticados e tratados no complexo hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.1.1 - Caracterização do papilomavírus humano

O papilomavírus humano (HPV, do inglês Human Papillomavírus) é um vírus pequeno que pertence à família Papillomaviridae (Reid & Campion, 1989), de replicação intranuclear (Campisi *et al.*, 2007), icosaédrico, com um diâmetro de aproximadamente 50nm, constituído de 72 capsômeros. Com especial tropismo para mucosa genital, bucal e respiratória, possui como elemento infectante um DNA de dupla fita que infecta as células epiteliais de mucosa e epiderme, podendo causar várias lesões hiperplásicas e neoplásicas (Zur Hausen, 1996; Campisi *et al.*, 2007).

Mais de 200 genótipos de Papilomavírus tem sido descritos na literatura com base na seqüência de DNA, muitos dos quais já identificados em doenças hiperplásicas e neoplásicas epiteliais de pele e/ou mucosa em seres humanos e/ou animais (P syrri & DiMaio, 2008). Mais de 100 genótipos já foram caracterizados como HPV, com aproximadamente 40 tipos identificados na mucosa genital (Burd *et al.*, 2003; Munhoz *et al.*, 2006).

Os Papilomavírus, tanto o encontrado em animais como em humanos, possuem a mesma organização genética. A informação genética é transcrita de uma das fitas de DNA por meio de RNAs mensageiros, sendo constituída de oito estruturas abertas para leitura designadas como *open reading frames* (ORFs) (Favre *et al.*, 1997).

O genoma desses vírus é formado por DNA circular com cerca de 8000 pares de bases, de 7.2 a 8 Kb (Reid & Campion, 1988), dividido em 3 regiões, a saber: 1) região de controle longa (LCR, do inglês *long control region*) não codificadora, representando cerca de 10% do genoma e contendo seqüências que regulam a transcrição genética; 2) regiões iniciais, perfazendo 45% da extensão do genoma, constituídas por genes que são transcritos inicialmente (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, do inglês *Early*, traduzido como precoce ou inicial), relacionados ao controle de replicação e transcrição viral; 3)

região tardia na qual se encontram os genes transcritos tardiamente (L1 e L2, do inglês *Late*, traduzido como tardio), associados à codificação de proteínas que compõem o capsídeo viral. O controle da expressão gênica é complexo e ocorre por meio de fatores transcricionais celulares e virais (Zur Hausen, 1996, McKaig *et al.*, 1998).

Algumas interações entre as proteínas iniciais codificadas pelo vírus e as proteínas celulares do hospedeiro são importantes para replicação e proliferação viral. Paralelamente, podem atuar desregulando o ciclo celular da célula hospedeira, concorrendo para sua transformação.

A proteína E1, codificada pela ORF E1, em conjunto com a proteína E2, é essencial para o início da replicação do DNA viral (Chow & Broker, 1994). Por sua vez, a proteína E2 regula a replicação do DNA viral e sua transcrição. Logo após a penetração do vírus na célula, forma-se um complexo entre as proteínas E2 e E1. Este complexo estimula e estabiliza a ligação de E1 à origem de replicação do vírus, definida como uma sequência rica em Adenina/Timina que apresenta um sítio de ligação para a proteína E1 e um sítio de ligação para a proteína E2, localizada na região proximal da LCR (Chiang *et al.*, 1992).

A proteína E3 ainda sem função identificável, não tem sido encontrada nos tipos já identificados de HPV. A proteína E4 ainda não tem sua participação bem definida no ciclo vital do vírus, mas trata-se de uma proteína sintetizada primariamente nas suas fases tardias (Roberts *et al.*, 1993). É traduzida por meio da fusão com os 5 primeiros aminoácidos de E1 para gerar as proteínas fundidas E1^{E4}. Este arranjo é necessário devido à falta do códon iniciador na ORF E4 que, por sua vez, faz uso da sequência E1 para que ocorra o início da tradução. Esta proteína é encontrada dentro das células da camada de diferenciação escamosa (superficial) do epitélio infectado, não sendo necessária para a transformação ou persistência episomal do DNA viral. Sua participação na infecção viral produtiva favorece a paralisação da diferenciação celular normal, permitindo a maturação viral e posterior liberação das partículas do Papilomavírus. (Wilson *et al.*, 2007). Isto parece ocorrer pela sua associação com tonofilamentos celulares levando ao rompimento da rede

de citoqueratinas do citoesqueleto celular e seu conseqüente colapso (Doorbar *et al.*, 1991).

A proteína E5 é uma proteína pequena, extremamente hidrofóbica, localizada principalmente nas membranas do retículo endoplasmático, no Complexo de Golgi e em menor proporção, na membrana plasmática (Conrad *et al.*, 1993). No papiloma bovino tipo 1 a proteína E5 desempenha um papel na transformação primária, através da associação com receptores dos fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), enquanto que sua função no HPV ainda não foi totalmente esclarecida (Genter *et al.*, 2003; Garnett *et al.*, 2006).

Em um estudo *in vitro* utilizando o HPV31, Fehrmann e colaboradores (2003) observaram que a proteína E5 parece atuar nas fases tardias do ciclo viral, modulando a ativação da proliferação de células diferenciadas além de replicação viral e a expressão de genes tardios virais. Estes achados foram corroborados parcialmente pelos achados de Genter *et al.*, (2003) que descreveram redução significativa na porcentagem das células da camada suprabasal que continuavam a sintetizar DNA quando da presença de HPV16 portador de proteínas E5 mutadas. Este fato, entretanto, não evitou completamente a amplificação do DNA viral nas camadas celulares diferenciadas. Paralelamente, a expressão de genes virais tardios e a perturbação da diferenciação normal dos queratinócitos foram mantidas nas células infectadas pelo HPV mutado, sugerindo aos autores um sutil papel de E5 no estágio produtivo da infecção pelo HPV16.

Por sua vez, as proteínas E6 e E7 estão associadas à indução da proliferação dos queratinócitos humanos, o que está diretamente associado à viabilidade do ciclo celular viral. Dos genes iniciais codificados, as oncoproteínas E6 e E7 estão sob controle dos genes iniciais inibitórios E1 e E2 (Chakrabarti & Krishna, 2003). Estes últimos podem ser deletados ou alterados durante a integração do genoma viral com o genoma do hospedeiro, levando a uma transcrição desregulada dos genes E6 e E7. Ademais, as proteínas E6 e E7 têm capacidade de ligar-se às proteínas celulares endógenas supressoras de tumor (crescimento celular) p53 e Rb, respectivamente, inativando-as. Estas

proteínas supressoras de tumor regulam os pontos de checagem do DNA na fase G1 e quando se encontram inativas, as células ficam mais propensas a entrar no ciclo celular (Tommasino & Crawford, 1995).

Estas informações são pertinentes para um bom entendimento do ciclo viral porque favorecem a replicação e manutenção do vírus dentro da célula hospedeira.

2.1.2 - A entrada e replicação do vírus na célula

A entrada do vírus na célula é um processo que abrange vários passos e começa com a ligação das partículas virais aos receptores celulares e a fatores de ligação. Depois de ligados, a maioria dos vírus é internalizada por meio de endocitose (Marsh & Helenius, 2006).

A infecção pelo HPV geralmente se inicia na camada basal e parabasal das células do epitélio escamoso que são alcançadas através de abrasão, ou na junção em que o epitélio muda do tipo escamoso estratificado para o colunar no cérvix uterino (Longworth & Laimins, 2004). Para que ocorra a ligação entre membrana celular e o vírus e conseqüente infecção, muitos tipos de HPV necessitam de um ligante do tipo glicoproteína heparan sulfato (HSPGs). Além disso, alguns estudos já relataram que o HPV pode interagir com componentes da matriz extracelular como a laminina-5. Esta glicoproteína é secretada pelos queratinócitos que migram em direção às camadas mais diferenciadas no epitélio lesado, o que sugere um modelo de infecção natural em que a laminina-5 pode contribuir para o destino final dos vírus HPV às células proliferativas do epitélio basal em regeneração. (Culpe *et al.*, 2006 a,b).

Uma vez aderidos à membrana celular, a entrada do vírus na célula envolve a internalização através da endocitose, um processo que para o HPV ocorre de forma lenta em um período de horas (Day *et al.*, 2007). A maioria dos vírus entra nas células utilizando-se da endocitose mediada pela clatrina, enquanto poucos parecem entrar através da cavéola. De uma forma clássica, os vírus endocitados via clatrina percorrem o interior da célula através de endossomos, enquanto os que entram via cavéola vão para uma estrutura intracelular conhecida como caveossomo antes de trafegar pelo retículo

endoplasmático (Pelkmans & Helenius, 2002). Estes dois caminhos antes considerados distintos, agora são considerados cruzados, visto que a carga viral pode se movimentar entre as vias (Smith *et al.*, 2008).

Os patógenos que entram na célula através da via endossomal são favorecidos pela queda do pH durante seu tráfego na célula hospedeira por favorecer mudanças conformacionais virais que facilitam o escape das proteínas virais e/ou genoma viral dos endossomos, passo esse que pode ser necessário à infecção viral (Gruenberg *et al.*, 2006).

O ciclo de vida do HPV está intimamente ligado à diferenciação dos queratinócitos das células hospedeiras. O seu complexo ciclo de vida constitui-se primeiramente na infecção e estabelecimento do DNA viral como um plasmídeo nuclear e manutenção destas cópias em baixos números nas células epiteliais basais em divisão; esta fase é caracterizada pela infecção não produtiva. Por fim, há uma produção elevada de cópias do DNA viral, estruturação de capsídeos, com formação e eliminação de vírions pelas células epiteliais diferenciadas. Estes passos caracterizam a infecção produtiva. (Campisi *et al.*, 2007).

O mecanismo de controle do ciclo celular viral, particularmente a infecção do vírus nas células basais ainda permanece obscuro. Pyeon *et al.*, (2009) encontraram em seu estudo que a progressão do ciclo celular para a mitose e, de forma particular, os eventos na prófase inicial são críticos para o estabelecimento da infecção pelo HPV.

O parasitismo viral desenvolve efeitos citopáticos importantes dentre eles o mais característico do ponto de vista histopatológico é a presença das células coilocíticas. O termo atipia coilocítica foi criado por Koss e Durfee em 1956 para descrever lesões do cérvix uterino que microscopicamente se caracterizavam pela presença de células epiteliais largas com núcleos irregulares hipercromáticos e pequenos, circundados por halos claros glicogenio-negativos, que foram reconhecidas como “células vazias”. Hoje se sabe que os coilocitos são patognomônicos da infecção pelo HPV, de forma que suas anormalidades representam o efeito celular letal da reprodução viral (Fornatora *et al.*, 1996). Combinadas com outras características histológicas

como a acantose, disqueratose e multinucleação dos queratinócitos, a presença dos coilocitos tem sido usada como uma evidência da infecção pelo HPV em lesões planas e papilomatosas da mucosa e epiderme (Kurman *et al.*, 1993).

Os efeitos citopáticos presentes nas células infectadas pelo vírus fundamentam vários tipos de doenças associadas ao HPV. Algumas delas são caracterizadas por lesões benignas da mucosa e da pele, a saber: verrugas comuns, papilomas de células escamosas, condilomas, hiperplasia epitelial focal, papilomatose de Bowen. Estas lesões se desenvolvem a partir da infecção pelo tipo de HPV considerados de baixo risco para o câncer, enquanto que os HPVs de alto risco estão relacionados a lesões potencialmente ou comprovadamente malignas. Como exemplo, podemos citar: neoplasias epiteliais intra cervicais, carcinomas cervicais (Castellsagué *et al.*, 2002), de pênis e vulva, condilomas gigantes de Bruschke e Lowenstein, câncer de pele não melanômico, carcinoma verrucóide labial (Mitsuishi *et al.*, 2005), carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Termine *et al.*, 2008), carcinoma esofágico (Liu *et al.*, 2005), carcinoma oral (Luo *et al.*, 2007), faríngeo e tonsilar (Klozar *et al.*, 2008), câncer colorectal (Bodaghi *et al.*, 2005).

2.1.3 - HPV em lesões benignas

A verruga vulgar destaca-se entre as mais prevalentes. Incidente na pele, mais freqüentemente, e também na mucosa bucal, são diagnosticadas em áreas queratinizadas, estando associadas com maior freqüência aos HPVs 2, 6, 11 e 57 (Padayachee, 1994). São caracterizadas clínico-histologicamente por pequenas projeções digitiformes de mucosa, que confere à lesão um aspecto verrucoso, semelhante à couve-flor, de superfície áspera, podendo variar desde a cor branca até o rosa, dependendo do grau de queratinização.

O papiloma de células escamosas é um tumor benigno relativamente comum do epitélio oral (Abbey *et al.*, 1980), sendo a lesão mais freqüentemente diagnosticada em crianças (Jones, 1965). Os tipos de HPV mais comuns encontrados nestas lesões são o 6 e o 11.

As lesões caracterizadas como condilomas (condiloma acuminado) são geralmente consideradas como doença sexualmente transmissível, afetando geralmente a mucosa do trato anogenital. Pode ocorrer a infecção da mucosa bucal devido a práticas sexuais que favorecem o contágio, mas também por autoinoculação e transmissão materna. A presença do HPV nestas lesões foi primeiramente demonstrada por meio da técnica de imunohistoquímica (Syrjänen, 1983) com uma positividade de aproximadamente 75%. Apresentam-se, em geral, como lesões múltiplas, um pouco maiores do que os papilomas de células escamosas (PCE).

O termo hiperplasia epitelial focal (Doença de Heck) foi introduzido por Archard *et al.*, 1965 para descrever elevações nodulares múltiplas da mucosa oral observada em populações indígenas americanas e nos esquimós do Alaska. Este tipo de lesão é raro na população caucasiana. Caracteriza-se como nódulos múltiplos elevados, planos ou arredondados. São assintomáticos e sua cor varia do pálido a cor da mucosa normal adjacente. Quando a lesão é estirada, tende a desaparecer. Alguns autores sugerem que exista fator hereditário ligado ao aparecimento da lesão (Schock 1969). Os tipos de HPV mais relacionados as lesões são o 13 e 32.

2.2 - HPV E CARCINOGENESE

2.2.1 – Evidências moleculares da associação do HPV com o câncer bucal

A interação viral com a célula hospedeira tem como objetivo principal a replicação viral e, para que isso ocorra, são necessários eventos que mantenham o DNA celular em constante divisão, mesmo nas camadas epiteliais mais diferenciadas. Evidências sugerem a participação de algumas proteínas virais iniciais neste processo.

A proteína p53 atua na célula como uma proteína de supressão tumoral em resposta a danos causados no DNA, guiando a célula para o atraso das fases G1 e G2 do ciclo celular. Este processo favorece tanto o reparo do material genético danificado, como a morte celular por meio da apoptose

(Chakrabarti & Krishna, 2003; Clarke *et al.*, 1993). Tem sido exaustivamente demonstrado que células infectadas por alguns tipos de HPVs (16 e 18) apresentam defeitos nos mecanismos celulares supracitados, em função da ausência de p53 (Kojima *et al.*, 2002). Esta alteração tem sido associada à proteína E6 viral que se associa com a proteína p53, favorecendo o aumento da sua velocidade de degradação por meio de um sistema de proteólise ubiquitina dependente.

Para desempenhar sua função de supressão tumoral, a proteína p53 atua na regulação da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, incluindo as proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclina (CDKs) como a proteína p21. Através da inibição das CDKs, a proteína p21 pode levar a célula ao atraso do ciclo celular e na indução da apoptose, visto que as CDKs encontram-se diretamente vinculadas a entrada da célula no ciclo proliferativo. Portanto, a degradação da proteína p53 e conseqüente desregulação da proteína p21 desfavorecem a atuação de mecanismos inibitórios de proliferação, deixando a célula mais susceptível a proliferação e a manutenção da atividade proliferativa celular. Estes eventos estão diretamente vinculados a introdução e fixação de mutações bem como na geração de instabilidade genética (Todd *et al.*, 2002).

Ademais, a proteína E6 pode ativar a telomerase, que é uma enzima importante para a manutenção das estruturas teloméricas nas extremidades do cromossomo. A telomerase está ativa em 90% das células imortais e do câncer, mas encontra-se ausente nas células somáticas normais. A falta da atividade da telomerase em células normais leva à erosão progressiva do DNA telomérico, levando à instabilidade cromossomal e senescência. Estudos recentes relatam que a proteína E6 pode induzir a atividade da telomerase, mas o exato mecanismo para a ativação transcricional ainda permanece por ser descoberto. (Chakrabarti & Krishna, 2003).

Além disso, a proteína viral E7 é capaz de interagir e desestabilizar a proteína codificada pelo gene do retinoblastoma (*pRb*). A pRb, que também é uma proteína supressora de tumor, quando hipofosforilada encontra-se na sua forma ativa e ligada a fatores de transcrição da família E2F, responsáveis pela

ativação de genes importantes para a entrada e progressão do ciclo celular (Pickesley & Lane, 1994). Em uma célula normal, quando a célula progride da fase G0 através da G1 até a fase S, o complexo ciclinas/quinases dependentes de ciclinas fosforilam a proteína Rb tornando-a inativa, resultando na liberação dos fatores transcricionais E2F e a conseqüente transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA e na progressão do ciclo celular (Chakrabarti & Krishna, 2003). Nas células infectadas pelo HPV, a proteína viral E7 liga-se à proteína pRb, seqüestrando-a, resultando na liberação do controle da divisão celular pela ativação transcricional de vários genes que estão envolvidos na proliferação celular (Huang *et al.*, 1993). Esta quebra do complexo pRb-E2F faz com que ocorra o encurtamento da fase G1 da mitose e crescimento celular desordenado das células HPV-positivas (Lim *et al.*, 2007). Além do mais, os membros da família Rb são os maiores reguladores da saída do ciclo celular que ocorre durante a diferenciação epitelial. Tendo sua função interrompida pela oncoproteína E7, a proteína Rb favorece então a replicação produtiva nas células suprabasais diferenciadas (Chellappan *et al.*, 1992).

Evidências experimentais *in vitro* têm mostrado que a proteína E5 em fibroblastos de ratos parece aumentar a proliferação celular na presença de fator de crescimento epidermal (EGF). Alguns autores sugerem que a proteína E5 interage com o receptor de EGF (EGFR) e reduz a degradação destes receptores, proporcionando um estado de maior susceptibilidade à proliferação, aspecto ainda questionado, que necessita de maior comprovação (Fehrmann *et al.*, 2003).

Ainda, em carcinomas cervicais, a ORF E5 parece ser deletada, mas em neoplasias intraepiteliais cervicais de baixo grau foram descritas quantidades relativamente grandes de mRNA da proteína E5. Isto pode sugerir que ela tenha alguma função nos estágios iniciais da progressão tumoral em carcinomas cervicais, mas poderia ser dispensável para a manutenção do fenótipo maligno (Stoler *et al.*, 1992).

A metilação do DNA tem sido encarada como uma forma de defesa celular já que silencia a transcrição de DNAs “estrangeiros” (Doerfler, 1992), estando também vinculada a progressão de alguns tumores. Proteínas

associadas ao controle da morte celular como as DAP *kinases* (do inglês, death-associated protein kinase) (Bialik *et al.*, 2006) encontram-se metiladas nos carcinomas de células escamosas (47%-77%) e em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (23%-64%) infectadas pelo HPV. Corroborando este achado, índices menores de metilação têm sido observados em células normais (0%-8%).

Outra evidência da associação do HPV com o câncer humano vem do fato de que a oncoproteína E7 pode ser induzida se ligar a proteína pRb inativando-a ou degradando-a, pela ação de produtos do gene *ras* ativado. Yoshida *et al* (2008) mostraram que a ativação de H-*ras* na presença de proteína E7 do HPV18, tem o potencial de retirar queratinócitos do crescimento senescente. Além disto, em cultura de queratinócitos sobre uma matriz colagênica, os autores mostraram que nestas mesmas condições, as células epiteliais proliferavam e invadiam a matriz de colágeno. Este processo foi dependente da ativação de metaloproteinases teciduais 2 e 9. Assim, os resultados mostram a influência da infecção viral tanto no aparecimento quanto na progressão tumoral.

Outro papel que parece ser desempenhado pelas proteínas virais E6/E7 diz respeito ao recrutamento de células endoteliais e conseqüente neoangiogênese necessária para a progressão tumoral (Chen *et al.*, 2007). Para que a angiogênese ocorra, os indutores da angiogênese devem predominar sobre seus inibidores, fazendo com que ocorra um aumento na densidade de microvasos na região (Bouck *et al.*, 2006). A importância do fator pró-angiogênese VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) tem sido descrito tanto no desenvolvimento de cânceres cervicais como em estudos *in vitro* (Smith-McCune *et al.*, 1997) e sustentado por vários estudos na literatura (López-Ocejo *et al.*, 2000; Toussaint-Smith *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2007).

Pan e colaboradores (2006) desenvolveram um estudo *in vitro* com o objetivo de estabelecer um modelo de carcinogênese para o CEB por meio da indução de imortalização de células epiteliais, utilizando para isso as proteínas E6/E7 e expondo os queratinócitos ao benzopireno. As células epiteliais orais humanas imortalizadas foram cultivadas por um ano e meio em

meio de cultura. Puderam ser observadas modificações morfológicas microscopicamente, associado ao aumento de mitoses. Na nonagésima terceira passagem as células epiteliais apresentavam a habilidade de formação de colônia em meio Ágar, o que confirmou as características malignas da célula. Na 55ª passagem, as células apresentavam o desenvolvimento de massa paraqueratótica e ainda na 69ª passagem apresentavam potencial para o desenvolvimento de CEB. Na 74ª e 96ª passagem desenvolveram lesões parecidas com carcinomas de células escamosa cervical grau I e II em ratos. Os autores sugerem que a presença das proteínas virais E6 e E7 possui papel relevante juntamente com benzopireno porque podem levar à transformação das células epiteliais em CEB.

Ainda, em outro estudo *in vitro* Kingsley e colaboradores (2006) avaliaram o potencial de infecção pelo vírus HPV16 em alterar a proliferação celular nos CEB. Os autores sugerem que existe associação entre a presença do HPV16 e o aumento do potencial proliferativo nas células epiteliais em meio de cultura *in vitro*. Ademais, as células infectadas apresentavam diminuição da adesão celular e alteração em sua morfologia. Os autores relatam com estes achados que a presença do HPV pode influenciar na carcinogênese e progressão dos CEB por meio de mecanismos diversos.

2.2.2 – Evidências epidemiológicas da associação do HPV com câncer bucal

O CEB é considerado um problema de saúde pública, tendo alguns de seus fatores etiológicos bem estabelecidos. Entretanto, uma pequena porcentagem da população (15-20%) que desenvolve esta neoplasia não apresenta exposição a estes fatores de risco. Por este motivo, alguns estudos sugerem que a presença do vírus HPV pode participar da gênese dos CEB. Entretanto, diferentemente do que ocorre com o câncer cervical, a relação entre a presença do vírus HPV e o desenvolvimento de CEB ainda não está bem estabelecida. Várias investigações tentaram fazer esta associação a partir da identificação de aspectos morfológicos da presença viral nos CEB, da marcação de proteínas virais, de sorologia, ou da própria presença do DNA do

HPV nas amostras de CEB, ou ainda por meio de estudos caso-controle, utilizando-se de diferentes amostras e técnicas de detecção da infecção viral (Chang *et al.*, 1990; Kojima *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004).

Ainda não existem critérios bem definidos para classificação dos HPVs em alto risco e baixo risco, o que poderia ser baseado em estudos epidemiológicos com o objetivo de fornecer o risco estimado e/ou em evidências do potencial oncogenético dos vários tipos de HPV. Entretanto, com base nas associações já estabelecidas entre HPV e câncer, os genótipos de HPV considerados de alto risco são: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 62, 66, 68, 73 e 82 (Bosh *et al.*, 1995; Zur Hausen, 1996; Miller & Johnstone, 2001; Correnti *et al.*, 2004; Nair & Pilai, 2005; Mitsuishi *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007). Destes, os HPVs 16 e 18 são os principais tipos de HPV que estão presentes na carcinogênese cervical (Zur Hausen, 1996). Outros genótipos do HPV tais como HPV 06, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 70, 72 e 81 são classificados como tipos de baixo risco por serem encontrados em lesões benignas como as verrugas genitais (Lorinez *et al.*, 1992; Miller & Johnstone, 2001; Muñoz *et al.*, 2003; Nair & Pilai, 2005).

Sugiyama *et al.*, (2003), utilizaram *primers* específicos para identificar os tipos de HPV 16 e 18 e através da técnica de PCR encontraram maior frequência de HPV16 em displasias epiteliais comparativamente a sua frequência na mucosa normal e carcinomas. Esta frequência também foi superior àquela observada nos casos de displasias que progrediram para carcinoma. Estes achados sugeriram aos autores que o HPV poderia atuar nas fases iniciais da carcinogênese, estimulando a proliferação celular.

Ibieta *et al.*, (2005), através da PCR, estudaram a prevalência da infecção pelo HPV em uma amostra de 51 casos de CEB e identificaram positividade em 21 lesões (41,2%). Todos os casos positivos estavam infectados pelo HPV 16. Estes achados sugeriram aos autores que o HPV pode se constituir em fator de risco para o desenvolvimento do CEB, independente da associação com álcool e fumo.

Esta percepção também tem sido reforçada pelos achados Correnti *et al.*, (2004). Estes autores utilizaram 18 amostras fixadas (16 CEB e duas

amostras controle de hiperqueratose e acantose, negativas para HPV) e realizando reações de PCR com *primers* degenerados MY09/MY11 para amplificação de fragmentos de 450pb. Os tipos virais foram determinados por meio de hibridização molecular. A presença do vírus HPV foi encontrada em 50% (8/16) das amostras de CEB e os casos de hiperqueratose e de acantose foram negativos para o vírus. Os autores sugerem possível associação do vírus com o desenvolvimento de CEB.

Da mesma forma, investigando a presença do HPV-38 em 53 amostras fixadas, Kojima *et al.*, (2002) utilizaram PCR para identificação deste genótipo, hibridização *in situ* e imunohistoquímica e encontraram 35/53 (66%) de positividade para o DNA do HPV38 utilizando a PCR. Todos os tumores que foram positivos para o HPV38 marcaram positivamente tanto na hibridização *in situ* quanto na imunohistoquímica. Os autores sugerem que o HPV-38, juntamente com outros fatores (uso de cigarro, álcool, idade, comportamento sexual) pode ser importante na carcinogênese do CEB, mas que outros estudos são necessários para um melhor esclarecimento entre a relação do vírus HPV e outros fatores carcinogênicos nos CEB.

O carcinoma verrucoso é considerado um carcinoma epidermóide de baixo grau por causa do seu crescimento lento e baixa incidência de metástase. Mitsuishi *et al.*, (2005) avaliaram a prevalência do vírus HPV em carcinoma verrucoso de lábio em cinco amostras de tecido frescas por meio da PCR. O resultado foi de 100% de prevalência do vírus nas amostras. Os tipos de HPV encontrados foram 2, 18, 20, 27, 57, 62. Ademais, uma seqüência parcial de um tipo desconhecido de HPV foi identificada em duas amostras. Três amostras apresentaram infecções múltiplas. Os autores concluíram que muitos HPVs de alto risco de pele e mucosa estão associados com a patogênese do carcinoma verrucoso de lábio.

Em um estudo desenvolvido no Japão, Sugiyama *et al.*, (2007) investigaram a presença do vírus HPV em amostras de CEB e sua possível correlação com o prognóstico dos pacientes em um acompanhamento de 5 anos. Para tanto, 66 amostras parafinadas tiveram seus DNAs extraídos e a presença do HPV16 E7 foi examinada por meio da PCR. A prevalência deste

genótipo nas amostras foi de 36%. Depois da análise de cinco anos de sobrevida, os autores concluíram que os pacientes sem metástases nodais ou positivos para o HPV16 apresentavam melhor prognóstico (94%), comparados a sua contraparte não infectada, sugerindo aos autores que a presença do vírus bem pode ser de significância no prognóstico nos pacientes com CEB.

Ainda no Japão, Luo e colaboradores (2007) investigaram a presença do HPV em amostras de raspado bucal de 51 pacientes com CEB, 46 lesões cancerizáveis (leucoplasias, fibroses e hiperplasia verrucosa), além de 90 amostras de mucosa normal. Seguindo a extração do DNA, a identificação de diferentes tipos de HPVs nas amostras foi realizada através PCR-*Nested* e *gen chip* array. Nas amostras cancerizáveis houve uma maior frequência de HPV (30%) do que nos controles (13%). A frequência de detecção do DNA do HPV também foi maior nas amostras de CEB (13 casos – 25%) quando comparado com os controles, mas este resultado não foi estatisticamente significativo. Em CEB positivos para a infecção pelo HPV, os tipos de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 e 52) foram significativamente mais frequentes que nos controles (21, 57% para os casos e 8,88% para os controles). Os tipos de baixo risco foram mais comuns em lesões cancerizáveis do que nos CEB e nos controles, cujas frequências foram 19,57%, 3,92% e 4,44%, respectivamente. Os autores sugeriram que os HPVs de alto risco podem ter papel na progressão tumoral dos CEB e que os HPVs de baixo risco estão associados com lesões cancerizáveis.

Contradizendo estes resultados, Smith *et al.*, (2007) encontraram anticorpos anti-HPV16 VLPs (semelhante a partículas virais, do inglês *virus like particles*) em 33,8% dos casos e 22,4% dos controles. Ainda, relataram anticorpos anti-E6 em 20,6% dos casos e 0,9% dos controles e anti-E7 em 18,6% dos casos e 0,6% dos controles. O risco para desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço estava elevado entre os que eram positivos para HPV16 VLPs, E6 e E7. A presença de anticorpos contra estas proteínas estava associada com o desenvolvimento de câncer na cavidade oral, orofaringe e com as seguintes variáveis: estágio do tumor, gradação histológica e status nodal. Os anticorpos anti E6 e/ou E7 foram encontrados em 74% dos

casos de tumores HPV16 positivos, mas em apenas 5% dos casos de tumores negativos para o HPV, sugerindo correlação entre estas duas variáveis. Os autores sugerem que a detecção destas proteínas pode ser de grande utilidade na escolha de terapias para os tumores relacionados ao HPV.

D'Souza *et al.*, (2007) investigaram a presença do HPV-16 em uma amostra de 100 casos de câncer de orofaringe por meio da hibridização *in situ*, utilizando tanto amostras fixadas quanto amostras frescas, tendo como controle 200 amostras de células epiteliais esfoliadas. Neste estudo, foram coletados também dados sobre características demográficas, higiene oral, história médica, história familiar de câncer, comportamento sexual e história de uso de cigarro, álcool e maconha pelos pacientes. Além disso, avaliou-se também a sorologia para a proteína L1 do HPV16. A prevalência do DNA do HPV16 nas amostras foi de 72% dos 100 casos com a doença. Ainda, 64% dos pacientes com câncer foram soropositivos para as oncoproteínas E6 e E7 ou ambas. Os autores encontraram associação significativa entre o número de parceiros sexuais, incluindo a prática de sexo oral e o carcinoma de orofaringe. Semelhante associação foi observada para infecção pelo HPV16 e também para a soropositividade para a proteína L1 do capsídeo viral do HPV-16. A soropositividade para L1 do HPV16 estava associada com o câncer de orofaringe, independentemente do uso de cigarro e álcool. Da mesma forma, esta associação estava aumentada nos pacientes que apresentavam o DNA do HPV16, independente do uso de cigarro ou álcool. Por outro lado, estes hábitos estavam associados com o câncer de orofaringe primariamente entre os pacientes sem exposição ao HPV-16. Com estes resultados os autores sugerem que o HPV apresenta papel relevante na carcinogênese de orofaringe, de forma semelhante aos fatores classicamente conhecidos como cigarro e álcool.

Ji *et al.*, (2008) analisaram a presença do vírus HPV em 88 casos de carcinoma de cabeça e pescoço e 342 controles pareados por sexo, idade, consumo de cigarro e álcool. Todas as amostras eram de sangue e a detecção do vírus foi feita por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) com anticorpos anti HPV-16. Dos casos,

46,3% eram positivos para o vírus, enquanto nos controles, apenas 13,2% estavam infectados. Os autores encontraram risco cinco vezes maior para desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço entre pacientes soropositivos e esta relação foi significativa estatisticamente para pacientes não fumantes. Estes achados sugeriram aos autores um possível papel do vírus no desenvolvimento desta neoplasia, principalmente nos casos em que hábitos já estabelecidos para sua gênese estejam ausentes.

Em outro estudo caso-controle, Anaya-Saavedra e colaboradores (2008) desenvolveram no México um estudo que compreendia 62 casos de CEB e 248 controles (4:1). Foram obtidos dados demográficos e clínicos e um questionário sobre comportamento sexual dos participantes da pesquisa. As amostras dos casos de CEB eram constituídas de tecido fresco enquanto os controles foram coletados através de raspado bucal e a presença do DNA do vírus foi obtida por meio da PCR. A frequência de HPV foi de 43,5% nos casos e 17,3% nos controles. Os tipos mais freqüentes foram o HPV-16 e 18, com frequências de 55,6% e 18,5% respectivamente. As análises estatísticas mostraram associação entre o HPV de alto risco e o CEB, juntamente com o uso de cigarro e álcool e a história familiar de câncer. Paralelamente, identificaram uma associação entre HPV de alto risco e idade da primeira relação sexual e o número de parceiros sexuais. Os achados dos autores sugerem que o HPV de alto risco está fortemente relacionado com o desenvolvimento de CEB nos pacientes do México.

Pintos *et al.*, 2008 desenvolveram um estudo caso-controle em Montreal e examinaram a associação entre a presença do HPV, a resposta sorológica e o risco de desenvolvimento de CEB levando em consideração a localização da lesão (tonsilas e base de língua e outros sítios). Dos 72 casos, 19,4% eram positivos para o DNA do HPV, e a chance de encontrar nos casos de CEB o DNA de HPVs de alto-risco foi maior do que os de baixo risco (odds ratio: 4.81), bem como para os cânceres tonsilares de forma isolada. A sorologia positiva para o HPV16 também estava associada com câncer tonsilar, entretanto, os autores não encontraram associação entre a soropositividade para o HPV16 e a detecção do DNA viral nas amostras. Os autores reafirmam

a relação causal entre o HPV e os cânceres tonsilares e alguns CEB, independente do uso de cigarro e álcool.

Em um estudo caso-controle, Furniss e colaboradores (2009) estudaram 1034 indivíduos (486 casos diagnosticados com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e 584 controles) para a presença de anticorpos contra a região L1 dos HPVs 6, 11, 16 e 18 através de amostras de sangue venoso. Os autores relatam que a presença de anticorpos contra o HPV6 estava associada com risco aumentado de câncer na faringe. Não houve associação entre o uso do cigarro e álcool e o estado sorológico do HPV6, mas o risco de desenvolvimento de câncer na faringe associado com uso crônico do cigarro foi maior entre os pacientes HPV6 soronegativos do que nos soropositivos. Da mesma forma, o uso crônico do álcool parece conferir maior risco de desenvolvimento de câncer entre os pacientes HPV6 soronegativos. Os autores concluem que pode existir interação entre a sorologia positiva e o uso crônico do cigarro e álcool, sugerindo que a patogênese do HPV nos cânceres envolve interações complexas com a exposição a fatores de risco já estabelecidos (uso do cigarro e álcool).

Por outro lado, alguns estudos não têm observado nenhuma associação entre HPV e câncer bucal.

A falta de correlação do vírus HPV com o CEB também tem sido defendida por Zhang *et al.*, (2004). Estes autores utilizaram 73 casos de CEB e 40 amostras de células da mucosa oral normal obtidas de pacientes submetidos a biopsias lesões benignas utilizadas como controles. A técnica de detecção foi a PCR. Embora estes autores tenham encontrado DNA do HPV 16 e 18 em suas amostras de CEB, nenhuma associação significativa foi observada. A partir destes achados, os autores afirmam que a presença do HPV não deve ser encarada, por si só, um fator decisivo na carcinogênese bucal, embora a mucosa oral possa servir como um reservatório para novas infecções pelo HPV e/ou fonte de lesões recorrentes por HPV.

Neste sentido, Boy *et al.*, (2006) afirmaram que provavelmente o HPV não é importante na gênese do CEB devido à baixa frequência de HPV encontrada em suas amostras. Estes autores realizaram um experimento para

avaliar a sensibilidade das técnicas de detecção do vírus HPV em CEB a partir de 59 casos, cujas amostras teciduais foram fixadas em formalina e incluídas em parafina. Para estas amostras, os autores testaram três técnicas na identificação do HPV, a saber: hibridização *in situ*, hibridização *in situ* com amplificação de sinal e reação da polimerase em cadeia PCR em tempo real (*real time* PCR). Os resultados mostraram a presença de HPV 18 em sete amostras de CEB identificadas pela técnica de PCR em tempo real. Nenhuma evidência de infecção pelo HPV pode ser observada a partir de outras técnicas. Os autores sugerem que o HPV não é fator importante na patogênese do CEB e sugerem que a técnica empregada é a principal razão para os resultados positivos em muitos estudos. Chama a atenção neste caso, que resultados positivos poderiam estar associados com contaminação ambiental, gerando falso-positivos.

A relação entre o prognóstico e a presença do vírus HPV em lesões bucais tem sido abordada por alguns autores. Sugiyama *et al.*, (2007) relataram melhor sobrevida específica da doença em CEB positivos para o HPV. Alguns autores justificam estes achados frente à possibilidade de haver um maior número de mutações em lesões HPV negativas, levando a um pior prognóstico para a doença (Chiba *et al.*, 1996; Mellin *et al.*, 2000) ou ainda por relatarem que os tumores infectados pelo HPV possuem maior sensibilidade aos tratamentos com radioterapia. Em alguns estudos, os tumores HPV positivos não estavam associados com o uso de cigarro e/ou álcool (Simonato *et al.*, 2008) e devido à ausência destes hábitos, os autores relatam que estes pacientes apresentariam menores chances de morte devido à recorrência ou a um segundo tumor (Gillison *et al.*, 2000). O efeito protetor do cigarro em neoplasias da cavidade oral e da orofaringe positivas para o vírus HPV foi justificado pelo aumento da queratinização da superfície do epitélio, o que dificultaria o acesso do vírus às camadas basais.

Klozar *et al.*, (2008) estudaram a relação da sobrevida relacionada à metástase regional em 81 pacientes com câncer oral ou de orofaringe, infectados ou não pelo HPV. A presença do DNA do HPV foi encontrada em 64% dos casos e houve relação estatisticamente significativa entre lesões que

eram HPV positivas e pacientes não fumantes e não etilistas. Ainda, os pacientes HPV positivos apresentaram melhor sobrevida global e sobrevida específica da doença quando comparados aos pacientes HPV negativos, mesmo na presença de outros fatores de risco como o consumo de álcool, uso de cigarro, idade, gênero, localização do tumor, gradação histológica, tamanho do tumor, incidência e extensão da metástase para linfonodos. Entretanto, os autores não encontraram associação significativa entre a presença do vírus HPV e metástase regional, mas relataram maior frequência de linfonodos positivos e de extravasamento extracapsular em pacientes HPV negativos, indicando uma forma mais agressiva de metástase regional. Os autores sugerem que a presença do HPV é importante fator de prognóstico para câncer oral e de orofaringe e deveria ser considerado frente às terapêuticas adotadas no tratamento destas doenças, achados que corroboram com outros autores (Ritchie *et al.*, 2003). Entretanto, o papel do HPV como fator de prognóstico ainda precisa ser mais bem elucidado.

No Brasil, a frequência de identificação do HPV tem sido relatada em estudos descritivos tanto em lesões cancerizáveis como em carcinomas invasivos, cuja frequência variou de 0% a 74% ((Rivero & Nunes, 2006; da Silva *et al.*, 2007). Todavia, estes dados têm sido obtidos a partir de estudos utilizando diferentes tipos de amostras, com metodologias variadas para identificação do HPV. Ainda, os dados de frequência do vírus nas lesões baseado em estudos caso-controle ainda são escassos (Cortezzi *et al.*, 2004, Acay *et al.*, 2008).

Xavier *et al.*, (2005) desenvolveram um trabalho para avaliar a prevalência de achados histológicos (coilocitos) indicativos da presença do HPV em 20 casos de CEB e da orofaringe. Encontraram 75% dos casos positivos para a presença de coilocitos e as localizações mais comuns das lesões foram palato e soalho bucal, ambos com 27% de frequência. Ao contrário do que foi descrito por outros autores, este estudo mostrou alta porcentagem de uso de cigarro e álcool no grupo que era positivo para a presença de coilocitos. Além disto, os autores descrevem maior presença da doença em homens (93,33%), mas a variação de idade entre os grupos

positivos e negativos para a presença de coilócitos não foi significativa. Os autores sugerem que a alta prevalência de coilócitos encontrados em sua amostra pode ser indicativa da presença do vírus, mas para a confirmação dos dados seria necessária por meio de aplicação de técnicas de biologia molecular (PCR).

Em um estudo desenvolvido em São Paulo, Miguel e colaboradores (1998) utilizaram amostras não fixadas de CEB diagnosticados em 45 pacientes atendidos em um hospital de referência. A presença do vírus foi investigada primeiramente através da PCR utilizando *primers* degenerados (MY/09 e MY/11). A hibridização *in situ* foi utilizada para a tipagem de 27 tipos diferentes de HPV. O DNA do vírus foi encontrado em cinco amostras de CEB (11%), sendo todos do genótipo 16. Os autores sugerem que os carcinógenos químicos parecem ter um papel mais relevante no que tange ao desenvolvimento de CEB, sugerindo que sejam ampliados os estudos referentes ao vírus HPV como fator etiológico da doença.

Para investigar a presença dos tipos virais 6/11 e 16/18 em lesões leucoplásicas (com e sem displasia) e em CEB, Soares CP e colaboradores (2002) avaliaram 30 amostras utilizando da técnica de hibridação *in situ* em tecido fixado em formol e incluído em parafina. A presença do HPV 16/18 foi encontrada em duas lesões com displasia (20%), classificadas pelos autores como carcinoma *in situ*. Não se observou reatividade em nenhum caso de CEB ou em leucoplasias desprovidas de atipias. Os autores sugeriram que a presença de HPVs de alto risco nas amostras de carcinoma *in situ* pode representar o envolvimento do HPV na transformação maligna celular da mucosa oral, mas outros estudos são necessários para elucidar o verdadeiro papel do vírus no processo de carcinogênese oral.

Cortezzi e colaboradores (2004) investigaram o papel do HPV e do polimorfismo da proteína p53 em CEB. Para isso, analisaram 50 tumores em amostras de tecido não fixado e 142 controles obtidos através de citologia esfoliativa de mucosa bucal. Todas as amostras tiveram o DNA extraído e em seguida foi feita a amplificação dos *primers* GP5+ e GP6+. A tipagem do HPV foi feita através de hibridização *dot-blot*. A marcação dos alelos da proteína p53

foi feita por meio da PCR. A prevalência do vírus HPV foi de 10,6% e 16% nos casos e controles respectivamente. O vírus HPV 16 estava presente em todas as amostras dos casos e na maioria dos controles (13/15) que também tiveram marcação para o HPV6/11 e HPV51/45. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Os autores concluíram que a infecção pelo vírus HPV não resulta em aumento do risco de desenvolver CEB.

Rivero & Nunes (2006) desenvolveram um trabalho objetivando a identificação da prevalência do vírus HPV em 40 amostras de CEB, sendo 23 fixadas e incluídas em parafina e outras 17 de tecido não fixado. Neste estudo, utilizaram a técnica de PCR para a detecção do DNA viral. A amplificação do vírus foi observada apenas nos controles positivos (condilomas) e os autores sugeriram que nem sempre o vírus participa no processo de carcinogênese do CEB. Consideraram ainda que as diferenças consideradas interestudos se devam a variações de caráter geográfico, bem como na metodologia empregada para a detecção viral.

Investigando a prevalência do vírus HPV em CEB de língua, da Silva e colaboradores (2007) desenvolveram um estudo a partir de 50 amostras de CEB linguais e 10 controles também de amostras frescas (não-fixadas) de pacientes sem história ou lesão evidente de CEB. A extração do DNA de todas as espécies e a detecção do HPV foi feita através da PCR. Das 50 amostras de língua inicialmente obtidas para o estudo, 37 (74%) foram positivas para os subtipos oncogênicos do HPV. Nenhuma das espécies foi exclusivamente positiva para os tipos virais não oncogênicos. Dos controles, apenas uma amostra foi positiva para um tipo não oncogênico. Os autores concluem que existe um maior risco de encontrar HPVs de alto risco em CEB de língua do que nos controles saudáveis.

Ainda, Soares RC e colaboradores (2007) analisaram a presença do vírus HPV em 75 amostras parafinadas de CEB por meio de PCR utilizando *primers* degenerados GP5+ e GP6+. A tipagem viral foi feita através de hibridização *dot-blot*. A presença do vírus foi encontrada em 18/75 (24%) dos casos avaliados no estudo. O HPV 18 foi o tipo viral mais prevalente (77,8%).

Com estes resultados, os autores sugerem a possível participação do vírus no desenvolvimento e progressão de um subgrupo destes tumores.

Oliveira e colaboradores (2008) investigaram a presença do vírus HPV e a expressão das proteínas p53 e bcl-2 em 88 casos parafinados de CEB. Para a detecção do vírus foi realizada a PCR seguida de hibridização *dot-blot*. Vinte e seis casos (29,5%) foram positivos para a presença do vírus através da PCR. A hibridização *dot-blot* identificou o HPV18 em 21 (80,8%) casos, HPV16 em um (3,8%) caso e uma combinação dos dois tipos em quatro (15,4%) casos. Nenhum outro tipo de HPV foi detectado na amostra. Os autores concluíram que apesar da prevalência do vírus HPV de alto risco ter sido de apenas 29,5%, é possível que ele contribua para o desenvolvimento de alguns casos de tumores.

Utilizando de 50 amostras parafinadas divididas em cinco grupos, a saber: leucoplasia sem displasia, leucoplasia com displasia leve, leucoplasia com displasia moderada, leucoplasia com displasia severa e CEB, Acay e colaboradores, 2008 estudaram a presença do vírus HPV através da hibridização *in situ* com amplificação de sinal utilizando sondas para os HPVs 6/11, 16/18 e 31/33, encontrando uma prevalência global do HPV de 24%, enquanto a porcentagem do vírus foi de 20%, 40%, 10%, 20% e 30% nos respectivos grupos. Os autores não encontraram associação estatisticamente significativa entre o grau de progressão de malignidade e a detecção do vírus. Dos 12 casos que foram positivos para HPV, seis (50%) eram positivos para os tipos 16/18, dois (16,6%) para os tipos 6/11 e apenas um (8,3%) para os tipos 31/33. Os autores sugerem que o vírus HPV não parece desempenhar um papel na carcinogênese bucal. Contudo, diante do aumento na prevalência da infecção por HPV comparado a mucosa normal e do fato de os HPVs de alto risco ter sido os mais freqüentes neste estudo, não é possível excluir o HPV como fator de risco na carcinogênese oral.

Utilizando amostras teciduais parafinadas de 33 CEB arquivadas em dois serviços de patologia do Rio Grande do Norte no período de 1996-2004, Soares RC e colaboradores (2008) encontraram 33,3% de positividade para DNA viral dos genótipos HPV 16 e 18. Utilizando neste trabalho uma

análise por PCR e hibridização *dot-blot*, os autores observaram que 81,8% das amostras continham material genético do HPV18. Neste estudo, observaram ainda que em apenas 2 casos apresentava infecção concomitante de HPV 16 e 18. Embora tivessem utilizado sondas para 19 tipos de HPV, nenhum outro tipo foi identificado no estudo. Para os autores, a baixa frequência de detecção do DNA do HPV nas amostras de CEB sugere uma possível participação do vírus no desenvolvimento e progressão de apenas um subgrupo destes tumores.

Para identificar a prevalência do HPV em amostras de CEB do soalho bucal, Simonato e colaboradores (2008) utilizaram da PCR em 29 amostras parafinadas. A presença do vírus foi detectada em 5/29 (17,2%) das espécies. Todavia, por causa da baixa frequência encontrada, os autores sugerem que o vírus não apresenta significância na carcinogênese dos CEB.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

- Identificar a frequência e os tipos de HPV em amostras teciduais de CEB em uma população de pacientes atendidos no complexo hospitalar da UFU;
- Identificar associação entre a presença de HPV e CEB, baseado nas frequências observadas para o grupo controle, considerando os diferentes genótipos e categorias virais quanto ao risco para o câncer;
- Identificar associação entre aspectos clínicos dos CEB, fatores sócio-demográfico e dado de história médica atual e pregressa dos pacientes com neoplasia e a presença de HPV.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 - AS AMOSTRAS

O presente trabalho foi realizado a partir de um estudo observacional do tipo caso-controle para identificação de diferentes tipos de HPV em CEB e sua associação com a doença. Para tanto, amostras de CEB e dos controles foram ensaiadas para detecção de DNA viral a partir de técnica da reação em cadeia da polimerase (*Nested-PCR*).

A amostra de casos constou de 50 pacientes portadores de CEB diagnosticados no complexo hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de março de 2007 a setembro de 2008. Estes casos foram diagnosticados em diferentes clínicas do Complexo Hospitalar da UFU, incluindo Pronto Socorro Odontológico, Clínica de Otorrinolaringologia, Ambulatório de Estomatologia e do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Dos casos foram coletadas amostras teciduais frescas (não fixadas) durante os procedimentos cirúrgicos utilizados para o diagnóstico (biopsia) e tratamento cirúrgico dos pacientes de acordo com as indicações pertinentes.

Todos os casos de CEB tiveram o seu diagnóstico histopatológico confirmados segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Barnes *et al.*, 2005).

Imediatamente após a coleta, as amostras foram estocadas em freezer a -80° C até o momento da extração, quantificação do DNA celular e a realização do PCR no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU.

Para o grupo controle, foram coletadas células epiteliais esfoliadas provenientes da mucosa bucal de 150 pacientes não portadores de CEB, atendidos nas mesmas clínicas de onde provieram os casos incluídos no estudo para diagnóstico e tratamento de outras doenças que não o CEB. A construção deste grupo foi realizada a partir do pareamento com os casos de CEB, tendo como referência sexo e idade, na proporção de três controles por caso (Schlesselman & Stolley, 1982). A idade dos pacientes do grupo controle variou de cinco anos para mais ou para menos em relação ao seu par do grupo

dos casos. Além disso, não podiam apresentar lesões que estivessem associadas com a presença do HPV.

A coleta de material dos pacientes deste grupo foi realizada a partir de raspados bucais, com a utilização de escovas citológicas (Cytobrush – Kolplast ci Ltda – Itupeva - SP) previamente umedecidas. O material coletado foi dispensado em microtubos contendo 500µL de tampão TLN [tampão de lise celular (solução de Tris 1M pH 8,0; solução de cloreto de sódio 3M; solução de EDTA 0,5M pH 8,0; água destilada)]. Até o momento da extração do DNA, todas as amostras ficaram estocadas em freezer -20°C no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Previamente a coleta das amostras, todos os indivíduos incluídos no estudo responderam a um questionário sobre dados sócio-demográficos (idade e sexo), história médica atual e pregressa (uso de prótese e história familiar de câncer) e exposição aos produtos do fumo e álcool, fatores potencialmente relacionados ao desenvolvimento do câncer bucal.

4.2 - EXTRAÇÃO DE DNA

A extração dos DNAs das amostras de CEB seguiu o seguinte protocolo: aos microtubos contendo pequenos fragmentos teciduais (aproximadamente 2mg) das amostras de CEC, foram acrescentados 500 µL de TLN, 20 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K, sendo incubados a 65°C em banho-maria por no mínimo 4 horas. Em seguida foram adicionados 350 µL de fenol, 336 µL de clorofórmio e 14 µL de álcool isoamílico. Após a agitação em vortex, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm (9726 *g*_{max}) por 15 minutos. Ao sobrenadante foram acrescentados 500 µL de isopropanol com subsequente incubação da solução -20°C por no mínimo 12 horas. Após nova centrifugação da solução por 10.000 rpm (9726 *g*_{max}) por 15 minutos, o pellet resultante foi lavado com 300 µL de etanol e as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm (9726 *g*_{max}). O DNA resultante foi diluído em água e armazenado em câmara fria a 4 °C até o momento da realização da PCR.

Os DNAs das amostras controle (células epiteliais descamadas) foram extraídos segundo protocolo descrito a seguir: as amostras foram primeiramente homogeneizadas em vórtex e transferidas para microtubos de 1,5ml. Após centrifugação a 10000 rpm (9726 gmax) por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido novamente para o tubo inicial, quando foram então acrescentados 250µL de TLN, 12µL de SDS 10% e 10µL de Proteinase K. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 60°C, durante um tempo mínimo de 4 horas. Após o acréscimo de 100µL de NaCl saturado, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e colocadas a -20°C por 15 minutos. Após nova centrifugação a 10000 rpm (9726 gmax) por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo então adicionados 500µL de álcool a 100%, e, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (9726 gmax) por 7 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foram acrescentados 350µL de álcool (70%), e as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm (9726 gmax) por 7 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram diluídas com 15µL de água destilada e, em seguida, homogeneizadas em vórtex. Todas as amostras foram estocadas em freezer (-20°C) até o momento da realização das PCR.

Todas as amostras foram então estocadas no freezer (-20°C) para posterior realização da PCR.

4.3 - OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES

Após testes preliminares, determinou-se que a concentração ideal de DNA para a primeira reação do grupo de casos foi de 5µL (aproximadamente 500ng) e de 2µL para a segunda. Para as reações de PCR utilizando as amostras do grupo controle seguimos um protocolo já estabelecido que utilizou 7 µL de DNA na primeira reação e 2µL na segunda reação da PCR (Goulart *et al.*, 2003).

Os *primers* específicos para a tipagem de 40 tipos de HPV foram organizados em 8 *kits multiplex* (Quadro 2), de forma que cada kit poderia tipar com segurança cinco tipos de HPV de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA encontrados. Este procedimento permitiu que se detectassem

múltiplos tipos de HPV utilizando-se um determinado multiplex (Goulart *et al.*, 2003).

4.4 – AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL POR PCR

A amplificação pela PCR foi realizada em duas etapas, a primeira com a utilização de *primers* consenso (MY09 e MY11) (Quadro 1), gerando fragmentos de DNA de 450 pares de base (pb).

Para esta etapa, foram utilizados os seguintes reagentes, com suas respectivas concentrações: 3,0 µL de tampão da Taq polimerase 10x (uso 1X); 1,5 µL de *primer* MY09n e para o MY11n; 0,4 µL de *primer* β1 e β2; 0,6 µL de dNTPs; 5,0 µL de DNA para o grupo de casos e 7,0 µL de DNA para o grupo controle; 0,3 µL de Taq DNA polimerase por reação e completando água até o volume final por reação de 30 µL.

As condições de amplificação foram: 94 °C por 1 minuto para a desnaturação do DNA, 50 °C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, 72 °C por 2 minutos para extensão dos *primers* e estas etapas foram repetidas por quarenta vezes. Para a extensão final do DNA, as amostras foram submetidas a 72 °C por 5 minutos e 4 °C também por 5 minutos.

Quadro 1 – Sequências de *primers* utilizados para a primeira reação da PCR

MY09-1	CGT CCM ARR GGA TAC TGA TC
MY09-2	CKN CCH ARD GGA AAC TGA TC
MY09-3	CKM CCH ARK GGA WTA TGA TC
MY09-4	CKD CCY ARD GGR AAT TGG TC
MY09-5	CGT CCM AAR GGA HAC TGA TC
MY11-1	GCN GAG GGH CAC AAT AAT GG
MY11-2	GCN CAG GGH CAB AAC AAT GG
MY11-3	CCH CAR GGH CAT AAT AAT GG
MY11-4	GCN CAG GGH CAT AAC AAT GG
MY11-5	GCY CAG GGH YWM AAC AAT GG

4.5 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL POR *NESTED-PCR*

Nesta etapa foram feitas oito reações de PCR com oito *kits multiplex* constituídos cada um por cinco pares de *primers* específicos para cinco genótipos de HPV em cada um deles. Os referidos *primers*, amplificaram regiões internas do fragmento obtido na primeira reação de PCR, o que permitiu a tipagem dos vírus nas amostras estudadas. Os tamanhos dos fragmentos obtidos, diferentes entre si, foram separados pela eletroforese em gel de agarose 2,5% (Quadro 2).

Quadro 2 – Tipos de HPV com os seus respectivos tamanhos de fragmentos utilizados nos oito kit multiplex para a tipagem do vírus.

TIPAGEM DE HPV - 40 TIPOS EM 8 MULTIPLEX															
Multiplex 1		Multiplex 2		Multiplex 3		Multiplex 4		Multiplex 5		Multiplex 6		Multiplex 7		Multiplex 8	
Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag	Tipo	Frag
														β-Glo*	366
51	338	33	316	31	311	MM7	305	06	306	42	294	11	291	74	328
66	285	55	279	35	276	56	270	26	285	62	249	43	244	82	266
68	239	18	237	39	238	57	235	59	219	54	213	70	208	69	237
44	206	45	193	52	192	73	180	61	175	16	175	30	172	71	202
34	170	67	141	58	127	53	127	64	110	MM8	83	72	74	81	140

*A beta-globina foi utilizada no multiplex 8 como **controle positivo** para o DNA.

Para a realização da *Nested-PCR* foram utilizados para cada reação: 3,0 µL de tampão da Taq polimerase 10X (1X); 3,0 µL de tampão *enhancer*. Para a amplificação da β-globina acrescentou-se 0,5 µL dos *primers* β2 e β3 no *multiplex* 8, além de 1,5 µL de *primer multiplex*; 0,5 µL de dNTPs; 2,0 µL de DNA; 0,4 µL de Taq DNA polimerase e completando com água até o volume final da reação atingir 30 µL.

As condições de amplificação foram: para a desnaturação do DNA as amostras foram submetidas a 95°C por 1 minuto, seguido de outro ciclo de 95 °C por 30 segundos; para anelamento, um ciclo de 57 °C por 30 segundos; e para extensão do DNA, outro ciclo de 72 °C por 40 segundos. Estas três últimas etapas foram repetidas por 35 vezes. Para a extensão final, as amostras foram submetidas por 5 minutos a 72 °C e por 5 minutos a 4 °C.

4.6 - ELETROFORESE

Os fragmentos resultantes da amplificação do DNA foram separados em gel de agarose numa concentração de 2,5%, submetidos a uma tensão constante de 180 volts para uma corrida rápida de aproximadamente 8 minutos, a fim de determinar as amostras positivas para HPV. Posteriormente, as amostras positivas no primeiro processamento da eletroforese foram aplicadas em outro gel de mesma concentração, utilizando uma tensão constante de 120 volts por aproximadamente 90 minutos.

As amostras positivas foram então classificadas em tipos virais (genotipadas) de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos dado pelo seu peso molecular, a partir de um marcador de 25 pares de base (pb) com bandas sucessivas que vão de 25 pb a 500 pb (Invitrogen, Carlsbad, USA).

4.7-ANÁLISE DOS DADOS

A análise descritiva dos dados consistiu na construção de tabela de distribuição de freqüências relativas das variáveis-exposição no interior dos grupos caso (participantes com diagnóstico de câncer bucal) e controles (participantes sem diagnóstico de câncer bucal).

A associação entre as variáveis-exposição e câncer bucal foi testada por meio da regressão logística condicional, uni e multivariada (Schlesselman & Stolley, 1982).

Inicialmente, foram rodados modelos univariados para a variável-interesse (desenvolvimento de CEB) e para as covariáveis (presença do HPV, história familiar de câncer, uso de prótese, histórico de tabagismo e histórico de consumo de álcool). Na análise univariada, a associação entre a variável-exposição e o evento é testada isoladamente, sem levar em consideração a contribuição das outras variáveis incluídas no estudo. Os achados foram considerados estatisticamente significante se $p < 0,05$.

Num segundo momento, a hipótese de associação entre infecção por HPV e câncer bucal foi testada utilizando-se o modelo de regressão logística multivariada, que leva em conta a contribuição simultânea de todas as

covariáveis investigadas. Esta análise permite mensurar a força da associação e sua significância estatística para cada uma das variáveis incluídas no modelo, ajustadas para as demais variáveis do modelo. Todas as covariáveis foram incluídas no modelo multivariado, seguindo um critério epidemiológico, e não estatístico.

A medida de associação utilizada foi o Odds Ratio, com respectivo intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas independentemente associadas ao evento, variáveis que, no modelo multivariado, apresentaram-se associadas ao câncer bucal ao nível de significância de $p < 0,05$. A condução da análise foi feita com o auxílio do pacote estatístico Stata, versão 9.0.

Para verificação da existência de associações entre as variáveis estudadas e o CEB, os seguintes parâmetros foram considerados:

1) Grupo de casos e controles positivos para HPV, considerando todos os tipos detectados;

2) Dois grupos classificados como alto e baixo risco para o câncer. Foram assumidos como de alto risco os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 62, 66, 68, 73 e 82 (Bosh *et al.*, 1995; Zur Hausen, 1996; Miller & Johnstone, 2001; Correnti *et al.*, 2004; Nair & Pilai, 2005; Mitsuishi *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007); para os de baixo risco os genótipos 06, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 70, 72 e 81 (Lorinez *et al.*, 1992; Miller & Johnstone, 2001; Muñoz *et al.*, 2003; Nair & Pilai, 2005).

3) Infecções múltiplas por HPV;

4) Idade (≥ 60 anos e < 60 anos);

5) Sexo (masculino/ feminino);

6) Uso de prótese (sim/não);

7) História familiar de câncer (sim/não);

8) Exposição aos produtos do fumo (tabagismo): as análises foram realizadas considerando três categorias, a saber: fumante ativo, não fumante e ex-fumante, sendo considerados ex-fumantes os pacientes que relataram ter abandonado o hábito de fumar anteriormente ao momento da entrevista;

9) Exposição aos produtos do álcool (etilismo): as análises foram realizadas considerando categorias, a saber: etilistas, não etilistas e ex-etilistas, adotando o mesmo critério acima descrito para os ex-fumantes;

As amostras dos casos foram analisadas para a presença de vírus, considerando os seguintes fatores: idade (< 60 anos e ≥ 60 anos), sexo (masculino/feminino); localização das lesões (orofaringe e outras localizações); uso ou não de prótese; tabagistas e não tabagistas, alcoolistas e não alcoolistas. Na análise considerando os estágios clínicos dos tumores, os casos foram inicialmente categorizadas em cinco estádios clínicos baseadas nos critérios considerados da UICC (International Union Against Cancer) and AJCC (American Joint Committee on Cancer), descritos por Barnes *et al.*, 2005. Em seguida, foram agrupadas como Doença Inicial (comportando os estádios clínicos zero, I e II) e Doença Avançada (comportando os estádios clínicos III e IV).

Todos os procedimentos relativos ao desenvolvimento do presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU. Todos os pacientes (casos e controles) envolvidos na pesquisa assinaram previamente um termo de consentimento livre e esclarecido conforme consta das orientações do Comitê de Ética e Pesquisa. Os anexos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos termos de consentimento e aos questionários aplicados aos indivíduos participantes da pesquisa.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

Foram incluídos neste estudo 50 pacientes com CEB (casos) e 150 pacientes sem CEB como grupo controle dos quais foram coletadas amostras de tecido (casos) e de células epiteliais descamadas provenientes da mucosa bucal (controle) para pesquisa de HPV.

A medida de idade para os pacientes com CEB foi de 58,1 anos (variando entre 36 e 84 anos) e de 59,2 (variando de 31 a 89 anos) para os controles. O pico de frequência dos CEB se deu na sétima década de vida (Figura 1).

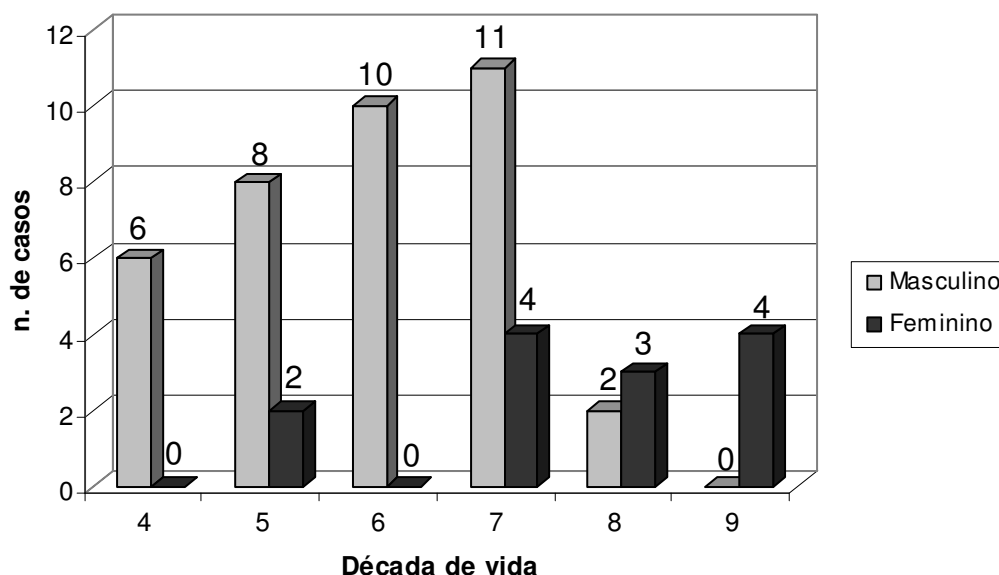


Figura 1 – Distribuição dos casos de CEB em função da idade dos pacientes por década de vida.

Entre os casos de CEB, 37 (74,0%) foram do sexo masculino e 13 (26,0%) do sexo feminino, com uma proporção de 2,8:1. A localização mais freqüentemente encontrada para os casos de CEB foi o lábio inferior, com 11 casos (22,0%) e borda lateral de língua, encontrada em 10 casos (20,0%). Seguiram-se o trígono retromolar e soalho bucal, com seis casos (12,0%) em cada localização. As freqüências de casos para as demais localizações estão representadas na Figura 2.

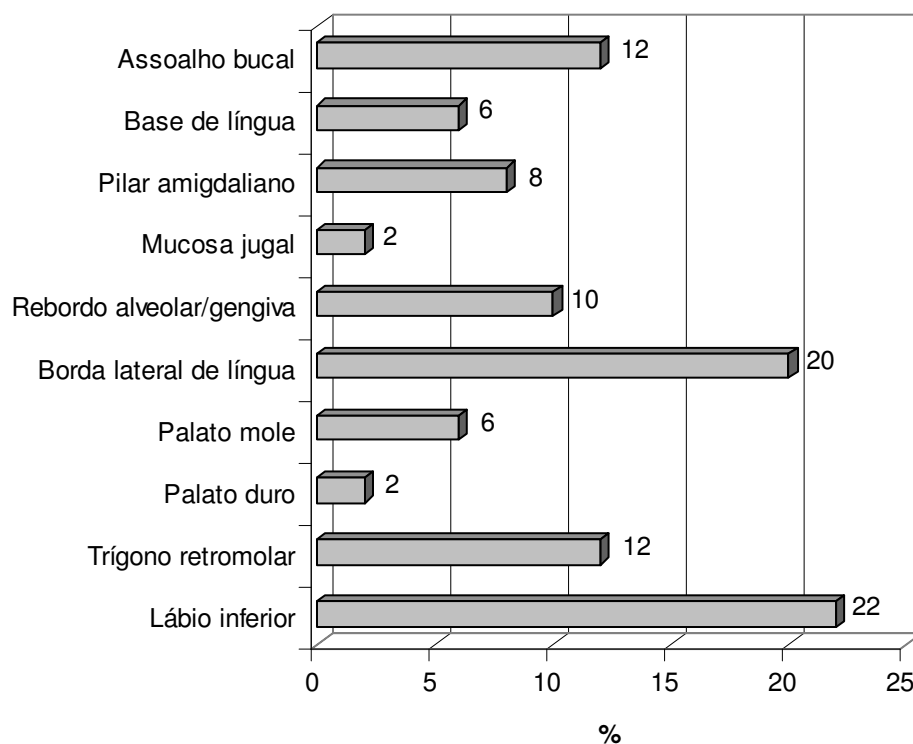


Figura 2 – Distribuição dos casos de CEB de acordo com sua localização

No que se refere ao estágio clínico da lesão, 25 casos (50,0%) foram diagnosticados como doença avançada, englobando estágio III (11 casos) e estágio IV (14 casos). Os demais pacientes distribuíram-se entre os estágios zero (um paciente), nove pacientes no estágio I e 15 pacientes no estágio II. (Figura 3).

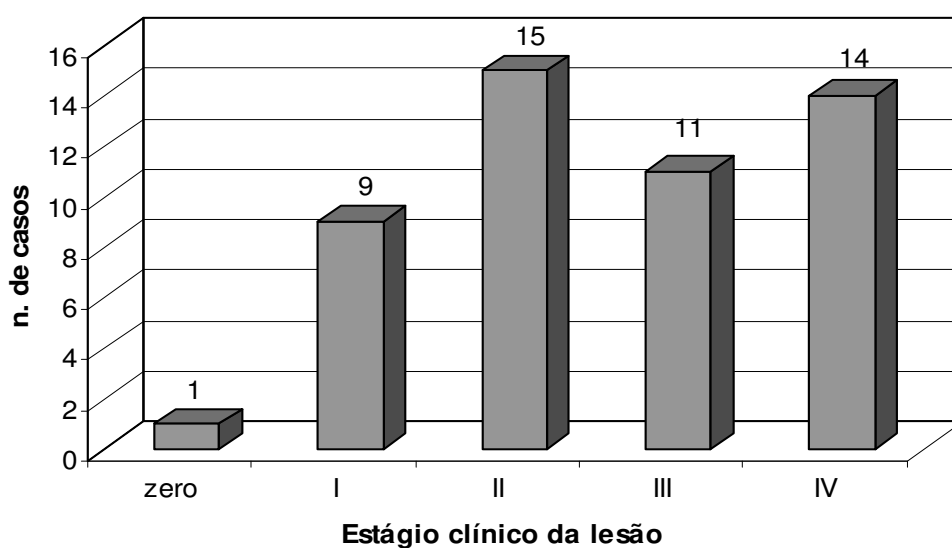


Figura 3 – Distribuição dos indivíduos de acordo com o estágio clínico da lesão.

Vinte e três pacientes com CEB (46,0%) faziam uso de prótese, enquanto que esta variável foi observada em 79 pacientes do grupo controle (52,7%). História familiar de câncer foi relatada em 22 casos (44,0%) dos pacientes com CEB enquanto que para os pacientes do grupo controle esta frequência foi de 53,3% (80 casos). Apenas um paciente (0,7%) desconhecia qualquer informação sobre história de câncer na família.

No que refere a exposição ao fumo, 18 pacientes com CEB (36,0%) relataram ser fumantes ativos, 24 (48,0%) eram ex-fumantes e apenas 8 (16,0%) eram não fumantes. Para o grupo controle, 38 (25,3%) eram fumantes ativos, 55 (36,7%) eram ex-fumantes e 57 (38,0%) eram não fumantes. A exposição aos produtos do álcool no grupo dos casos foi registrada para 19 pacientes (38,0%), caracterizados como estilistas crônicos. Neste grupo, 13 (26,0%) foram ex-etilistas e 18 (36,0%) eram não etilistas. Para o grupo controle, 14 (9,3%) eram etilistas crônicos, 27 (18,0%) eram ex-etilistas e 109 (72,7%) eram não etilistas.

5.2 - DETECÇÃO DE HPV NOS CEB E CONTROLES

Para o grupo de CEBs foram identificados 11 casos (22,0%) positivos para HPV, cujos genótipos foram 6, 44, 54 e 55 (baixo risco) e 16 e 31 (alto risco). Houve uma maior frequência dos HPV tipo 6 e 44, identificados em quatro casos de CEB (8,0%). O HPV 54 foi encontrado em três amostras (6,0%), enquanto o genótipo 55 foi tipado em apenas uma amostra (2,0%). Outras duas amostras estavam infectadas com HPV 31 (4,0%) e outra com o HPV 16 (2,0%) (Figura 4).

Apenas três pacientes do grupo de casos apresentaram infecções múltiplas (6,0%). Um dos pacientes apresentou três tipos de HPV, envolvendo vírus de baixo e alto risco (tipos 6, 31, e 54); as outras duas amostras apresentavam apenas dois genótipos de HPV, todos de baixo risco: uma com os genótipos 6 e 54 e outra com os genótipos 54 e 55.

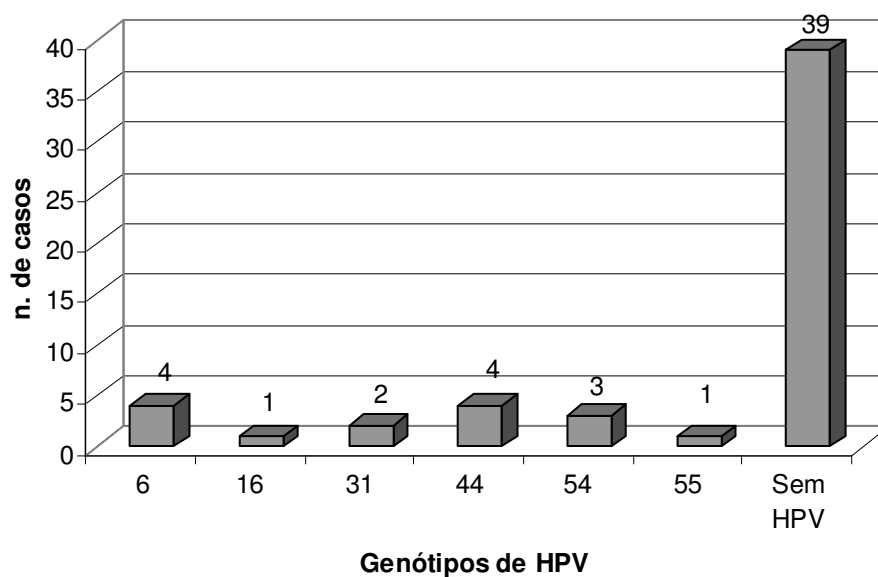


Figura 4 - Distribuição dos 50 casos de CEB segundo o número e tipos de HPV identificados na amostra.

Nas amostras do grupo controle encontramos 14 amostras (9,3%) positivas para o vírus HPV. A maior frequência encontrada neste grupo foi do HPV 66, que foi tipado em nove amostras (6,0%). Do total de amostras no grupo controle, 13 (8,7%) apresentavam HPV de alto risco (33, 35, 45, 52, 62 e 66). Apenas uma amostra estava infectada com o vírus de baixo risco, tipo 42 (Figura 5). No grupo controle um paciente apresentou infecção múltipla pelos HPVs 35 e 52.

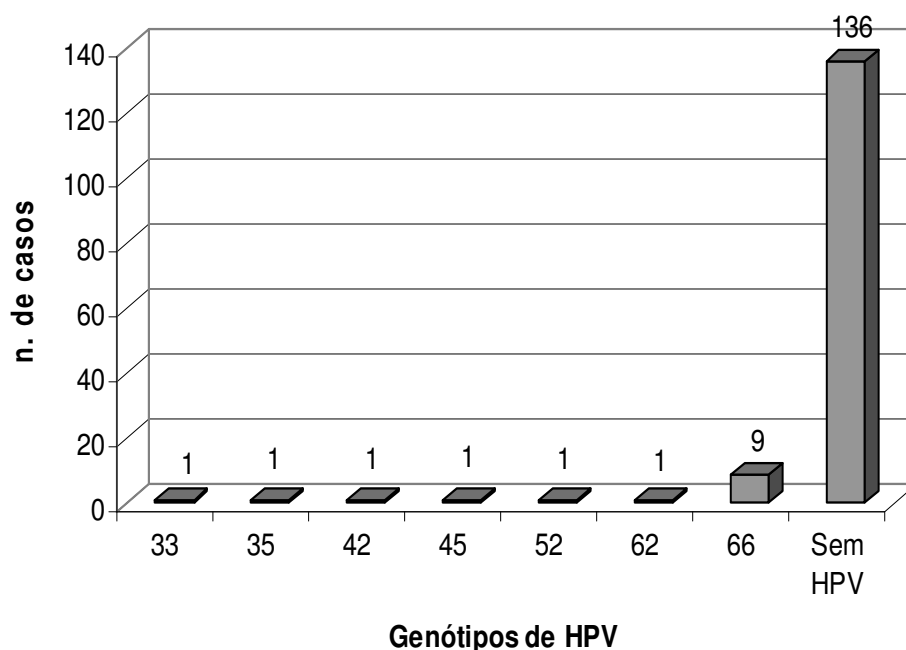


Figura 5 - Distribuição dos indivíduos da amostra controle segundo os tipos virais encontrados.

No grupo de casos de CEB positivos para a infecção pelo vírus HPV, sete pacientes eram do gênero masculino (63,7%) e quatro (36,4%) do gênero feminino. A incidência do vírus no gênero masculino no grupo controle foi de 9 (64,3%) pacientes e de 5 (35,7%) no gênero feminino.

Os estádios clínicos mais freqüentes encontrado no grupo de CEB positivos para o HPV foram III e IV, caracterizada como doença avançada, com quatro pacientes (36,4%) em cada um destes estádios. Os genótipos 6 e 54 foram tipados em três pacientes (27,3%) com doença avançada, enquanto os genótipos 31 e 44 em apenas duas (18,2%)(Figura 6).

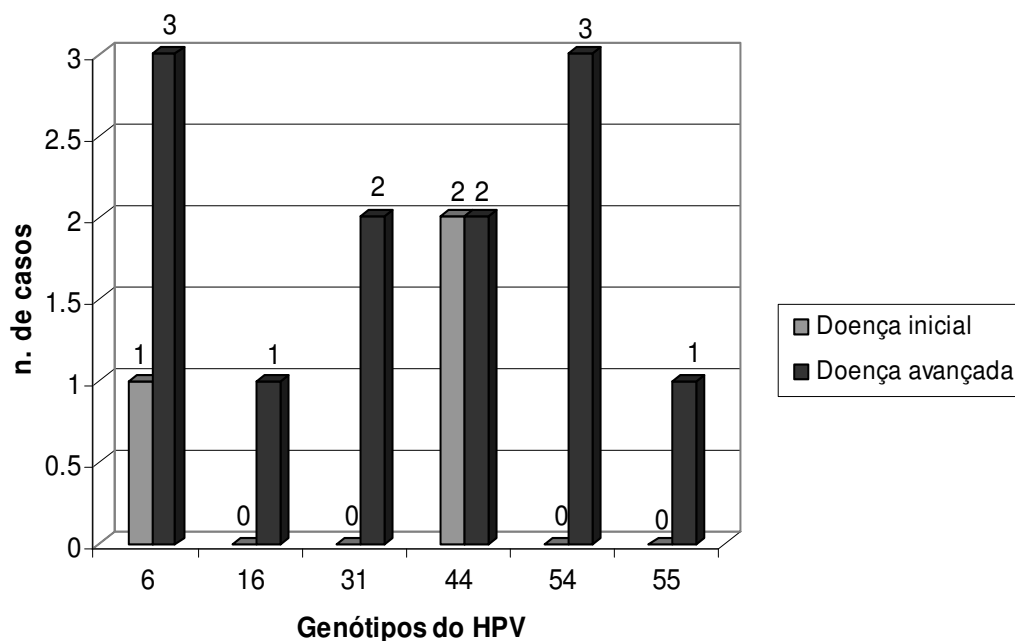


Figura 6 – Número de casos de CEB com seus respectivos genótipos de HPV com relação ao estágio clínico da doença

Os sítios mais comuns infectados por HPV foram a borda lateral de língua (quatro amostras) e pilar amigdalino (três amostras). As amostras da borda lateral de língua estavam infectadas com os seguintes HPV: uma infecção múltipla dos HPV 6, 31 e 54, duas amostras com infecção pelo HPV 44 e uma amostra pelo HPV 6. As três amostras do pilar amigdalino estavam infectadas por duas infecções múltiplas, uma de HPV 6 e 54 e outra por HPV 54 e 55. A outra infecção era simples e apresentava o genótipo 44. Considerando apenas a localização orofaríngea (base de língua, palato mole e amígdala), a positividade para HPV foi observada em quatro (40,0%) dos 10 casos identificados nesta localização (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos casos positivos para o HPV, seus genótipos tipados e localização da lesão.

Caso número	Tipos de HPV	Localização da lesão
5	6	Trígono retromolar
17	6/31/54	Borda lateral delíngua
18	6/54	Pilar amigdaliano
21	44	Borda lateral de língua
27	44	Borda lateral de língua
29	44	Pilar amigdaliano
30	44	Base de língua
31	54/55	Pilar amigdaliano
32	31	Mucosa jugal
34	16	Trígono retromolar
40	6	Borda lateral de língua

Quando levamos em consideração a presença do vírus e o uso de prótese no grupo de casos, encontramos 6(54,5%) pacientes. Para o grupo controle, estavam presentes apenas 8(57,1%) pacientes que apresentavam estas características. Apenas três pacientes (27,3%) do grupo de CEB positivo para o vírus HPV tinham história familiar de câncer e neste grupo de pacientes encontramos uma infecção múltipla de HPV 6,31 e 54. Nas outras duas amostras foram tipados os genótipos 16 e 44. Nos pacientes do grupo controle que apresentaram infecção pelo HPV, 8 (57,1%) pacientes apresentavam história familiar de câncer, e o genótipo do HPV66 foi o mais encontrado (5 amostras).

Para o grupo de pacientes com câncer e e com exposição ativa aos produtos do fumo, oito foram positivos para HPV, perfazendo 72,7% dos indivíduos. Apenas 3 (21,4%) do grupo controle eram tabagistas e HPV positivos. Do grupo de etilistas, cinco pacientes (45,5%) com CEB foram positivos para HPV. Quando combinado etilismo e positividade para o vírus no grupo controle encontramos 2(14,3%) pacientes. Cinco casos (45,5%) de CEB positivos para o vírus HPV eram fumantes e etilistas, enquanto que nos

controles nenhum paciente apresentava estes três fatores de risco combinados.

As Tabelas 2 e 3 apresentam respectivamente os dados referentes às diferentes variáveis estudadas para casos e controles, as análises uni e multivariada (regressão logística). Na Tabela 4, podemos observar os dados de frequência do HPV nos casos de CEB, distribuídos segundo variáveis sócio-demográfica dos pacientes, história médica atual e pregressa, dados do estilo de vida dos pacientes e aspectos clínicos das lesões.

Tabela 2. Distribuição (em números absolutos e relativos) de casos e controles de acordo com as variáveis-exposição, Uberlândia, Brasil, ano 2007-2008.

Variáveis	Casos (n=50)		Controles (n=150)	
	N	(%)	N	(%)
<i>Sexo</i>				
Masculino	37	(74,0)	111	(74,0)
Feminino	13	(26,0)	39	(26,0)
<i>Idade</i>				
< 60 anos	26	(52,0)	77	(51,3)
≥ 60 anos	24	(48,0)	73	(48,7)
<i>Infecções por HPV</i>				
Não	39	(78,0)	136	(90,7)
Sim	11	(22,0)	14	(9,3)
<i>Uso de prótese</i>				
Não	27	(54,0)	71	(47,3)
Sim	23	(46,0)	79	(52,7)
<i>História familiar de câncer</i>				
Não	28	(56,0)	80	(53,3)
Sim	22	(44,0)	70	(46,7)
<i>Histórico de tabagismo</i>				
Nunca fumou	8	(16,0)	57	(38,0)
Ex-fumante	24	(48,0)	55	(36,7)
Fumante atual	18	(36,0)	38	(25,3)
<i>Histórico de alcoolismo</i>				
Nunca bebeu	18	(36,0)	109	(72,7)
Bebeu no passado	13	(26,0)	27	(18,0)
Bebe atualmente	19	(38,0)	14	(9,3)

Tabela 3. Odds Ratio (bruto e ajustado) e respectivos intervalos de confiança 95% para câncer bucal, obtidos por meio de regressão logística condicionada, uni e multivariada, Uberlândia, ano 2007-2008.

Variável	OR Bruto ^a (IC 95%)	Valor de p ^c	OR ajustado ^b (IC 95%)	Valor de p
<i>Infecções por HPV ^d</i>				
Não	1,00		1,00	
Sim	2,85 (1,15–7,02)	0,002	2,25 (0,83-6,13)	0,113
<i>Uso de prótese</i>				
Sim	1,00		1,00	
Não	0,73 (0,37-1,47)	0,378	0,89 (0,38-2,06)	0,778
<i>História familiar de câncer</i>				
Não	1,00		1,00	
Sim	0,90 (0,48-1,69)	0,750	0,99 (0,48-2,08)	0,996
<i>Histórico de tabagismo</i>				
Nunca fumou	1,00		1,00	
Ex-fumante	3,04 (1,27-7,29)	0,013	2,33 (0,84-6,43)	0,103
Fumante ativo	3,58 (1,35-9,45)	0,010	2,83 (0,92-8,72)	0,070
<i>Histórico de alcoolismo</i>				
Nunca bebeu	1,00		1,00	
Bebeu no passado	5,78 (1,94-17,2)	0,002	5,05 (1,62-15,80)	0,005
Bebe atualmente	14,22 (4,47-45,3)	<0,001	10,98 (3,33-36,15)	<0,001

(a) OR Bruto (IC95%) = Odds Ratio Bruto (Intervalo de Confiança 95%), obtido por meio de regressão logística condicionada, univariada.

(b) OR Ajustado (IC 95%) = Odds Ratio Ajustado (Intervalo de Confiança 95%), obtido por meio de regressão logística condicionada, multivariada, considerando todas as variáveis do modelo.

(c) Significativo quando < 0,05.

(d) As análises univariada e de regressão logística para verificação de associação entre HPV de alto e baixo risco e com infecção múltipla não foram estatisticamente significantes.

Tabela 4 - Distribuição dos casos de CEBs segundo a presença de HPV e diferentes variáveis sócio-demográficas dos pacientes e clínico-patológicas das lesões.

Variáveis	HPV+ (n/%)	HPV- (n/%)	<i>Odds ratio</i> <i>IC 95%</i>	<i>p</i> *
Idade				
< 60 anos	4(36,4)	22(56,4)	0,44 (0,11 – 1,76)	0,31
≥ 60 anos	7(63,6)	17(43,6)		
Sexo				
Masculino	7(63,6)	30(76,9)	0,53 (0,12 – 2,21)	0,44
Feminino	4(36,4)	9(23,1)		
Localização				
Orofaringe	4 (36,4)	6 (15,4)	3,14 (0,69 – 14,1)	0,19
Outras	7 (63,6)	33 (84,6)		
Uso de prótese				
Sim	6(54,5)	17(43,6)	1,55 (0,40 – 5,96)	0,73
Não	5(45,5)	22(56,4)		
Histórico de tabagismo				
Sim	8(72,7)	29(74,4)	0,92 (0,20 – 4,16)	1,0
Não	3(27,3)	10(25,6)		
Histórico de alcoolismo				
Sim	5(45,5)	27(69,2)	0,37 (0,09 – 1,45)	0,17
Não	6(54,5)	12(30,8)		
Estádio da doença				
Doença Inicial	3(27,3)	22(56,4)	0,29 (0,06 – 1,26)	0,17
Doença Avançada	8(72,7)	17(43,6)		

* – foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Na análise univariada, foram estatisticamente significantes as associações envolvendo as variáveis câncer e HPV, câncer e fumo e câncer e álcool. Na análise multivariada (regressão logística), somente o consumo de álcool mostrou ser independentemente associado ao câncer. Após o ajustamento por tabagismo e consumo de álcool, a associação entre infecção pelo HPV não se sustenta. Ajustando as variáveis álcool e cigarro separadamente para testá-las para a associação HPV e câncer, observamos que a associação entre HPV e câncer permanece significativa quando o ajustamento é feito unicamente para o tabagismo, mas quando levamos em consideração a variável álcool, não existe associação. A associação entre HPV e câncer está sendo confundida pela variável consumo de álcool. Também, nenhuma variável estudada nos casos de CEB foi estatisticamente associada a presença do HPV, quer seja como grupo, categorizada por risco de câncer ou como infecção múltipla.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho ficou demonstrada uma frequência relativamente baixa de HPV em CEB (22,0%), mais alta, todavia que aquela observada no grupo controle (9,3%). Quando observamos apenas a frequência no grupo de tumores orofaríngeos, identificamos um aumento na proporção de casos infectados pelo HPV (40,0%), sugerindo, aparentemente uma preferência topográfica para a infecção viral. Nossos achados ainda mostraram que nos CEB encontramos uma menor proporção de vírus de alto risco oncogênico, com apenas três casos em 11 positivos para HPV (27,3%). O contrário foi notado entre os pacientes controles, nos quais predominaram os vírus de alto risco, notadamente o tipo 66, observado em 92,9% da amostra, um achado incomum comparativamente aos da literatura. Embora tivéssemos observado uma associação entre infecção pelo HPV (como grupo) e câncer em uma análise univariada, não foi possível identificar esta associação na análise multivariada (regressão logística). Vale ressaltar também a inexistência de associação considerando nas análises HPV de alto e baixo risco ou os casos de infecção múltipla. Nenhuma variável sócio-demográfica ou clínica relativa aos casos de CEB pôde ser relacionada à infecção viral. Estes resultados sugerem que embora não se possa excluir a participação do vírus no crescimento tumoral, aparentemente não deve ser implicado como um fator causal independente.

A prevalência do HPV em mucosa bucal e em câncer bucal, particularmente o CEB, tem sido objeto de discussão na literatura, dada a extensa variabilidade de índices relatados (Ritchie *et al.*, 2003; Pintos *et al.*, 2008; Anaya-Saavedra *et al.*, 2008; Klozar *et al.*, 2008). Tanto para a mucosa bucal e tecidos vizinhos, quanto para os CEB os índices de frequência de detecção do HPV têm variado de 0 a 100% (Miller & Johnstone, 2001; Boy *et al.*, 2006, Rivero & Nunes, 2006), com variações na frequência dos diferentes genótipos virais (Gillison *et al.*, 2000; Kreimer *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2003; Acay *et al.*, 2008). Torna-se significativa, neste sentido, a discussão que se estabelece quanto à relevância da representatividade dos dados obtidos. Para tanto, a primeira questão a ser analisada são as características das amostras

estudadas. É fundamental que uma maior atenção seja dada na discussão dos resultados quanto a potencial influência da procedência geográfica dos indivíduos avaliados e, por consequência, às diferenças aparentes nos hábitos de risco para infecção viral a eles vinculados (Ibieta *et al.*, 2005).

Além disto, outros fatores também têm sido mencionados nesta avaliação como sexo e idade dos pacientes e localização anatômica de coleta das amostras, por exemplo. A propósito, a orofaringe tem sido mais usualmente relacionada à presença do vírus que as outras localizações bucais e áreas vizinhas, com frequências entre 18 e 45% (Ritchie *et al.*, 2003; Kreimer *et al.*, 2005, Tachezy *et al.*, 2005; Andrews *et al.*, 2009). Na mesma linha de pensamento, é fundamental que também se considere os diferentes tipos de comportamento de risco para a infecção viral como um elemento que deve ser considerado na análise da diversidade de frequências relatadas. Nesta perspectiva, deveriam também ser considerada, por exemplo, características das práticas sexuais, a saber, tipos de práticas sexuais e quantidade de parceiros, além também de co-infecções com outros agentes infecciosos responsáveis por quadros de imunodeficiência. A presença de mais de um parceiro sexual e práticas de sexo oral tem sido descrito como fatores que aumentam a probabilidade de infecção pelo HPV (Herrero *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2003).

Não menos importante nesta discussão, tem sido o papel da metodologia de detecção na interpretação e valorização dos resultados. As discrepâncias de resultados observadas têm também sido atribuídas a diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção do HPV (McKaig *et al.*, 1998; Ha & Califano, 2004). A propósito, achados histológicos decorrentes do efeito citopático viral já foram apontados como referência para identificação da infecção pelo HPV. Entre estes, citam-se os critérios maiores dados pela presença de coilocitose, presença de halos perinucleares, displasia nuclear, e os critérios menores, entre os quais temos disqueratose, metaplasia atípica, macrócitos, multinucleação celular (Syrjanen *et al.*, 1983; Castro & Bussoloti Filho, 2003). Estes achados são particularmente fáceis de identificar em lesões benignas tais como papiloma de células escamosas, condiloma

acuminado entre outras (Madinier & Monteil, 1987). Todavia, estes aspectos são extremamente difíceis de serem associados à infecção viral nos CEB, dada a grande frequência com que são encontrados em lesões não associadas primariamente ao HPV. Muitas das atipias são decorrentes de degenerações e morte celular que apresentam aspectos morfológicos semelhantes àqueles que são decorrentes da infecção viral. Portanto, embora possam até apresentar níveis apreciáveis de sensibilidade, carecem de especificidade, podendo assim concorrer para o aparecimento de casos falso-positivos. Estas considerações ganham ainda mais importância, se considerarmos que apenas uma parte das células tumorais pode apresentar infecção e, mais, que a infecção esteja associada a níveis diferentes de produção de material genético viral. Daí, portanto, a necessidade mencionada recorrentemente na literatura de que estas avaliações sejam conduzidas a partir de testes com alta sensibilidade e especificidade de detecção viral (McKaig *et al.*, 1998; Ha & Califano, 2004).

Seguindo esta tese, outros métodos discutidos na literatura chamam a atenção pela maior especificidade e sensibilidade, entre os quais imunohistoquímica, hibridização *in situ*, hibridização Southern blot, dot blot, hibridização dot reversa e a reação em cadeia da polimerase (PCR) nas suas diferentes variações (Castro & Bussoloti Filho, 2003).

A imunohistoquímica e a hibridização *in situ*, particularmente, são consideradas técnicas de baixa sensibilidade por detectarem vírus quando presentes em mais de 10 cópias de DNA viral por célula. Além do que, a imunohistoquímica, quase sempre realizada em material fixado, pode estar vinculada a resultados não representativos tendo em vista que a fixação pode induzir alterações estruturais na molécula que interferem na identificação do material viral. A limitada disponibilidade de anticorpos, em especial para os diferentes tipos que já foram caracterizados segundo o seu potencial carcinogênico acrescenta mais um ponto negativo à utilização da técnica. (Castro & Bussoloti Filho, 2006).

A hibridização já apresenta uma sensibilidade maior, sendo muito utilizada na identificação do HPV em amostras teciduais. Em especial a hibridização Southern blot, dot blot, hibridização reversa que podem detectar

entre uma e 10 cópias de DNA viral celular (Miller *et al.*, 1996). Estas características garantem mais especificidade ao processo, embora seja trabalhosa e demorada. O princípio básico está na formação de dupla fita de DNA ou RNA pelo pareamento do DNA (ou RNA) recombinante marcado com o material genético viral na célula hospedeira (Syrjanen, 1990). E, mais recentemente, a introdução da PCR tem proporcionado uma maior sensibilidade ao processo de identificação, já que pode detectar quantidades mínimas de DNA-alvo, por meio de sua amplificação com o uso de enzima bacteriana - Taq Polimerase (Gravitt *et al.*, 2000). As amostras passam por variações de temperatura que faz com que o DNA desnature, logo em seguida, os *primers* se anelam e se estendam na região complementar à sua sequência (Sotlar *et al.*, 2004). Tanto na hibridização *in situ* quanto na técnica de PCR, algumas críticas têm sido colocadas quanto aos resultados obtidos utilizando material fixado e incluído em parafina. Alterações genéticas decorrentes da fixação poderiam introduzir falhas na detecção do material genético viral. Assim, o ideal para estas situações, seria a utilização de amostras de tecido fresco, ou seja, não fixado, armazenado em baixas temperaturas, no sentido de preservar o material genético celular (Chang *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2008).

Estas considerações técnicas são relevantes na valorização e interpretação dos resultados, pois, ao lado do significado da influencia do vírus HPV no aparecimento e na progressão do tumor, sua presença está associada a repercussões favoráveis no tratamento e prognóstico (Chiba *et al.*, 1996; Sugiyama *et al.*, 2007). Assim, conhecimento de dados concretos sobre o risco de infecção bem como das taxas de infecção seriam parâmetros a considerar em qualquer planejamento de ações preventivas, como também para planejamento das abordagens terapêuticas, em especial no que concerne ao custo-benefício destas iniciativas. Já se pode identificar na literatura, investigações sugerindo que as lesões HPV positivas poderiam responder bem a tratamentos radio e quimioterápicos, refletindo um melhor prognóstico de sobrevida para o paciente (Mellin *et al.*, 2000).

Procurando minimizar os efeitos relativos às limitações técnicas na identificação do HPV, utilizamos no presente trabalho, um grupo de pacientes

consecutivamente diagnosticados com CEB no complexo hospitalar da UFU. Destes pacientes recolhemos amostras de CEB que foram imediatamente armazenadas em freezer a -80° C, no sentido de preservar ao máximo o material genético alvo de nossa investigação. Neste sentido, a ausência de fixação eliminou as influências deletérias ao material genético decorrentes da mesma. Assim, optou-se pelo uso da *Nested-PCR* (PCR aninhado) utilizando para a segunda reação o *multiplex*. Com a primeira reação, foi possível alcançar maior especificidade, reduzindo ao mínimo a possibilidade de amplificação de DNA externo (contaminação), aumentando também, simultaneamente, a sensibilidade. Nesta técnica, a primeira etapa de amplificação resulta em um molde de DNA que contém o segmento de interesse na amplificação, característico do material genético alvo. Assim, utilizou-se na primeira etapa *primers* MY09/11 que amplificaram um segmento de DNA altamente conservado do gene L1 do HPV, constituído de 450 pb. Em um segundo momento, estes segmentos foram amplificados utilizando *primers* em kits *multiplex* que poderiam amplificar material genético viral de 40 tipos diferentes, incluindo tipos de HPV caracterizados como de baixo e alto risco para câncer cervical (Cagliano *et al.*, 2005; IARC, 2007). Desta forma, este tipo de reação tem como vantagem o ganho em especificidade e eficiência, uma vez que o DNA-molde na segunda etapa está em concentrações altíssimas, e os *primers* da segunda etapa têm menos chances de anelamento em seqüências inespecíficas, dada à redução do tamanho do alvo em que irão se anelar.

Embora a utilização do *Nested-PCR* associado ao *multiplex* possam ter trazido ganhos quanto a confiabilidade na identificação do HPV, questões tem sido levantadas quanto a certeza da detecção corresponder a presença do vírus na célula neoplásica (Ibieta *et al.*, 2005; Boy *et al.*, 2006). Este fato deve ser sempre considerado, tendo em vista que a irregularidade morfológica do crescimento neoplásico poderia favorecer esta possibilidade. Embora consideremos improvável que este fato se aplique ao nosso trabalho tendo em vista que os fragmentos foram coletados da intimidade da lesão, mas não em áreas de necrose por profissionais bem treinados, é imperativo que

para este tipo de análise, este detalhe seja considerado no planejamento da coleta de amostras.

Outro aspecto do trabalho que merece ser destacado é o emprego de um desenho caso-controle no presente estudo. Este desenho é usualmente utilizado para estudar exposição a fatores que seriam supostamente associados a eventos que são considerados raros. A finalidade principal deste tipo de estudo é a investigação de associações causais. Como regra, faz-se a comparação entre grupos, um com doença e outro sem doença para investigar possibilidades diferenciadas de exposição a determinado fator supostamente associado à doença (Schlesselman & Stolley, 1982).

O câncer bucal pode ser considerado um evento raro, tendo em vista que, dados do Ministério da Saúde reportam a ocorrência em torno de 10 casos/100.000 habitantes, equivalendo a aproximadamente 0,01% (Wunsch-Filho et al, 2002; Brasil MS, 2008). Da mesma forma rara é a possibilidade de detecção do HPV. A maior parte dos estudos descritivos no Brasil consideram a frequência de HPV em CEB menor que 50% (Miguel *et al.*, 1998; Rivero & Nunes, 2006; Soares RC *et al.*, 2007; Acay *et al.*, 2008; Simonato *et al.*, 2008).

Assim, constituídos os grupos e estabelecidas as frequências de exposição para cada variável estudada, são realizadas análises estatísticas para identificação de associação entre a determinada variável e a doença estudada. Neste sentido, segundo o teste, é importante que os controles sejam constituídos com números iguais ou maiores que os casos. Em tese, à medida que aumentamos o número de controles, aumenta também (até o limite de quatro por caso) poder estatístico da análise. Assim, coletamos os casos incidentes no período de aproximadamente 18 meses perfazendo um número de 50 casos consecutivos de CEB, diagnosticados histopatologicamente conforme critérios da OMS (Barnes *et al.*, 2005). Adicionalmente, optamos pela utilização de pareamento considerando três indivíduos controles por caso (Schlesselman & Stolley, 1982). Desta forma, estes estudos proporcionam dados sobre associação de uma determinada variável de estudo com a doença, exatamente porque prevê que a análise estatística seja realizada considerando um dado de possibilidade de exposição na população sem a

doença. Ademais, optamos por este desenho em função da escassez de estudos desta natureza (Cortezzi *et al.*, 2004). A grande maioria dos estudos brasileiros é de caráter descritivo ou realizado com outros objetivos que descrever a frequência de HPV em amostras de CEB (Miguel *et al.*, 1998; Soares CP *et al.*, 2002; Fregonesi *et al.*, 2003; Rivero & Nunes, 2006; Mazon, 2007; da Silva *et al.*, 2007; Soares RC *et al.*, 2007; Acay *et al.*, 2008).

Uma das vantagens apresentadas por este estudo é a procedência das amostras. Tanto os casos quanto os controles eram provenientes do mesmo Complexo Hospitalar que é um centro regional de referência em saúde. Além do mais, os controles foram coletados nas mesmas clínicas de onde provieram os casos de CEB, evitando a ocorrência de viés em nosso estudo, diferentemente de outros estudos em que amostras de caso e controle provinham de populações distintas (Cortezzi *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que o HPV foi identificado em 22,0% dos casos de CEB, valor este dentro das variações observadas na literatura mundial (Garlick *et al.*, 1991), independentemente das diferentes técnicas de detecção do HPV utilizadas (Miller & Johnstone, 2001; Boy *et al.*, 2006). No Brasil, especificamente, variações de frequências também tem sido relatadas. Utilizando técnicas de PCR associadas à hibridização *dot-blot* e com amplificação de sinal, outros grupos no Brasil tem observado frequências semelhantes (entre 11% e 30%) de positividade para HPV (Miguel *et al.*, 1998; Soares RC *et al.*, 2007; Acay *et al.*, 2008). Neste caso, é importante ressaltar que todas as amostras apresentaram diversidade quanto à topografia dos tumores. Nestes estudos, os autores identificaram HPVs 6, 11, 16, 18, 31, e 33. Chama a atenção o trabalho de Soares RC e colaboradores (2007) que, não obstante utilizarem sondas para tipagem de 19 tipos, só observaram os tipos 16 e 18 em sua amostra.

Lamentavelmente, não foi possível fazer maiores apreciações comparativas dos resultados quanto às frequências individuais dos genótipos detectados em função de que nos três estudos citados acima, o número de *primers* utilizados na genotipagem foi menor que aqueles utilizados no presente

estudo, chegando à possibilidade de detecção de, no máximo, 27 tipos de HPV (Miguel *et al.*, 1998; Soares RC *et al.*, 2007; Acay *et al.*, 2008)

Este espectro de variações de detecção em função de especificidades de sondas tem sido mencionado por Miller & Johnstone (2001), em um estudo de metanálise a propósito da relação entre HPV e doenças de boca, incluindo o CEB. Neste estudo os autores mostraram que os estudos apresentavam-se heterogêneos quanto aos métodos de detecção do HPV que classificaram como de baixa, média e alta sensibilidade. Não obstante a alta variabilidade observada, seu estudo mostrou que os tipos 16 e 18 foram os mais freqüentes entre as lesões malignas, com poucos relatos de outros vírus oncogênicos (alto risco) nos estudos revisados. A propósito, estes achados têm sido confirmados por estudos posteriores (Sugiyama *et al.*, 2003; Kreimer *et al.*, 2005; Nair & Pilai 2005; Sugiyama *et al.*, 2007). Além disto, dados da metanálise também evidenciaram uma probabilidade quase cinco vezes maior de encontrar vírus de alto risco comparativamente aqueles de baixo risco nas amostras de CEB, com maior variabilidade para o primeiro grupo. Ainda, os resultados deste estudo, propuseram aos autores considerar que a freqüência de HPV no câncer bucal é maior que se imagina e que a baixa freqüência relatada (entre 20% e 30%) estaria associada a fatores como tamanho da amostra, métodos de coleta e preservação inadequados e sensibilidade das técnicas de detecção.

Como mencionado anteriormente, embora nossa amostra possa ter limitações quanto ao tamanho, foram utilizadas técnicas de coleta e preservação, bem como de identificação de DNA do HPV dentro dos preceitos que apontam para maior sensibilidade de detecção. No que refere à presença de HPV de alto risco neste estudo, encontramos nos casos de CEB apenas 3 (27,3%) amostras infectadas com HPV de alto risco. Não obstante, nossa amostra mostrou apenas um caso (9,1%) (localizado em trígono retromolar) positivo para HPV 16 e duas amostras (18,2%) infectadas pelo HPV31 localizadas em mucosa jugal e em borda lateral de língua. Chamou atenção, entretanto, o alto percentual de tipos de baixo risco, entre eles 6, 44, 54 e 55, este último ainda não categorizado quanto ao risco para câncer. No estudo de

Miller & Johnstone (2001) os autores também relataram uma maior quantidade de trabalhos nos quais se pode detectar os tipos 6 (baixo risco) e 33 de alto risco em amostras de CEB. Ainda, em uma revisão sistemática, Kreimer *et al.*, 2005 relata que tipos de HPVs considerados de baixo risco para o desenvolvimento de cânceres cervicais, como o HPV6, estava presente em um grande número de CEB e que tipos de HPVs de alto risco (com exceção dos HPVs 16 e 18) eram raramente ou nunca tipados em amostras de CEB. Seria interessante questionar se realmente a presença do HPV de alto risco nas amostras significaria uma maior chance para o desenvolvimento de CEB ou se representaria apenas uma coinfeção não existindo uma relação causal entre a presença do vírus HPV e o desenvolvimento desta neoplasia. Estudos observacionais de coorte seriam recomendáveis nesta situação. Estas diferenças de freqüência de infecção e principalmente de genótipos para o HPV na presente amostra nos remetem a possibilidades de variações de detecção geograficamente determinadas, como comentado anteriormente.

Além disto, caberia neste sentido, verificar se a presença da infecção viral poderia contribuir decisivamente em vias de carcinogênese alternativas às classicamente conhecidas que são dependentes da ação de fatores como fumo e álcool. Dois caminhos distintos para o desenvolvimento de CEB foi recentemente proposto; um deles em que a carcinogênese bucal se desenvolveria a partir de fatores de risco já bem estabelecidos como o cigarro e o álcool e o outro em que o processo se daria por meio da infecção pelo HPV em que estes fatores descritos seriam encontrados em baixa freqüência (Tachezy *et al* 2005; Applebaum *et al*, 2007; D'Souza *et al.*, 2007; Anaya-Saavedra *et al.*, 2008). Alguns estudos, entretanto, não sustentam esta hipótese (Pintos *et al.*, 2008; Furniss *et al.*, 2008), assim como este, que encontrou entre os casos de CEB com infecção positiva para o vírus HPV apenas 3 casos (27,3%) de pacientes não fumantes e 6 (54,5%) eram não etilistas. Entretanto, a verdadeira contribuição do HPV e sua interação com o fumo e o álcool na etiologia do CEB ainda precisa ser esclarecida.

Diferentemente destes achados, da Silva e colaboradores (2007) observaram uma positividade de 74% em uma amostra de 50 pacientes com

CEB exclusivamente de língua. Neste caso, os autores utilizaram um sistema de detecção para 40 tipos de HPV, por meio de técnica de PCR. Embora não tivessem detalhado os tipos detectados, os autores identificaram neste estudo somente HPV oncogênicos (alto risco) nos casos, comparativamente ao controle (10 pacientes) entre os quais apenas um tipo não oncogênico foi detectado. Estes índices são extremamente elevados em comparação aos nossos resultados, provavelmente em função da amostra, que seria mais identificável com uma topografia orofaríngea. Outros estudos, utilizando amostras mais homogêneas, provenientes de regiões orofaríngeas também observaram maiores frequências (Ritchie *et al.*, 2003; Kreimer *et al.*, 2005). Este aspecto fica mais evidente também para a nossa amostra. Quando separamos os nossos casos pela localização orofaríngea (base de língua, palato mole e pilar amigdalino) foi possível observar 40% de positividade, coincidente com os dados da literatura que observaram uma maior frequência e “associação” do HPV com carcinomas epidermóides de orofaringe (Tachezy *et al.*, 2005; Andrews *et al.*, 2009).

Ademais, a análise univariada nos permitiu observar uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção viral (como grupo, independentemente do tipo ou categoria de risco) e o CEB. Por esta análise também foi possível identificar, ademais, associação entre o CEB e exposição aos produtos de fumo e álcool. Todavia, quando estes resultados foram analisados em modelo de regressão logística, nenhuma associação entre HPV e câncer foi identificada. Neste caso, observamos apenas uma associação com a exposição ao álcool, sugerindo uma relação indireta entre o vírus e o câncer. Provavelmente, na amostra analisada, a exposição a fatores de risco para o câncer como o álcool, por exemplo, que também agride a mucosa, produziu condições ambientais que permitiram mais facilmente o contato com o HPV e sua internalização. Situação similar tem sido descrito sobre o potencial permeabilizante dos produtos do álcool na mucosa bucal que facilitaria a penetração de moléculas derivadas dos produtos do fumo, facilitando assim a ação carcinogênica deste último (Bagan & Scully, 2008)

Cabe neste ponto ressaltar que, este é o primeiro estudo com desenho caso-controle desenvolvido em uma população brasileira, o que também dificulta maiores discussões. Ainda que o tamanho de nossa amostra não seja grande, a obtenção de amostras de tecido fresco de CEB e a utilização da PRC como técnica de detecção e tipagem viral falam em favor da consistência dos nossos resultados e ainda apontam diretrizes que podem ser seguidas por outros trabalhos desenvolvidos no Brasil.

Adicionalmente, não foi possível identificar qualquer associação do vírus com nenhum dado sócio-demográfico ou clínico-patológico dos pacientes do grupo de casos, tais como idade, sexo, estadiamento clínico. Estes dados, embora descartem uma associação a priori, não são definitivos para demonstrar uma ausência de participação do vírus na carcinogênese. Provavelmente, proteínas virais já conhecidas que interagem com o genoma humano interferindo com os mecanismos de controle da proliferação celular (p53 e pRb, principalmente) podem não ser decisivos para desencadear o processo, mas podem interferir na carcinogênese para alguns pacientes.

Resta ainda identificar os motivos pelos quais a presença do HPV contribui para melhoria no prognóstico do tumor. Provavelmente, seu papel na carcinogênese esteja associado à modulação de algum mecanismo de controle da proliferação que esteja mais preservado, ou a um menor número de mutações estejam presentes nestes casos ou que sua presença leva à abolição de vias de carcinogênese vinculadas à progressão de fenótipos mais agressivos (Sugiyama *et al.*, 2007). Mais estudos são necessários para esclarecer estes aspectos.

Em adição ao que já foi considerado na presente discussão, o conhecimento da prevalência do HPV em indivíduos na mucosa normal sem lesões ativas aparentes deveria ser considerado primariamente. Isto porque todas as suposições sobre a relação causal entre o HPV e câncer devem considerar os dados de permeação do vírus na população em geral para que os resultados da associação com doença possam ser adequadamente interpretados. Dados da literatura têm mostrado, em diferentes partes do mundo, uma ampla variação de frequência do HPV em mucosa normal,

variando 5 a 20% (Cortezzi *et al.*, 2004). No Brasil, há ainda uma deficiência de estudos que proporcionem uma visão clara sobre a prevalência do HPV na população (Oliveira *et al.*, 2008). Estes estudos também mostram taxas variando de 4,0% (Acay *et al.*, 2008) a 10,6% (Cortezzi *et al.*, 2004). Nossos resultados no grupo controle mostraram uma frequência de 9,3% que está dentro do intervalo já observado na literatura, tanto para o Brasil como no exterior. Todavia, estes dados não devem ser encarados como representativos da população quer seja hospitalar quer seja da cidade de Uberlândia ou região, já que o grupo examinado apresenta características de estratificação sócio-demográficas vinculadas aos dados proveniente dos casos em função do pareamento, que faz parte do desenho do estudo caso-controle. Para tanto, estudos epidemiológicos baseados em amostragem populacional mais representativas deveriam ser analisadas.

Treze amostras (92,9%) no grupo controle estavam infectadas com HPVs de alto risco. A alta frequência do HPV de alto risco no grupo controle (13/14) pode sugerir que somente a presença do vírus não seja fator decisivo para o desenvolvimento de CEB, sendo necessária a associação de outros fatores que contribuiriam para a carcinogênese desta neoplasia. Ou ainda, o vírus HPV seria apenas um agente comensal na mucosa bucal ou que esta serviria apenas como reservatório para o vírus, diferentemente do que acontece na mucosa genital. Em um estudo no Brasil (Sacramento *et al.*, 2006), a prevalência do vírus HPV em mucosa oral normal da orofaringe foi de 14,0% e os genótipos encontrados foram 16, 18, 52 e 61. Destes, apenas o HPV 61 é considerado de baixo risco. Os autores questionam se a orofaringe serviria como reservatório para o vírus, que seria facilitado pela semelhança entre o epitélio da orofaringe com o epitélio do cérvix uterino ou se a resposta imunológica neste sítio seria diferente dos outros sítios de cabeça e pescoço. Se a presença de tipos de HPV de alto risco na mucosa oral normal leva à uma maior predisposição ao desenvolvimento de doenças relacionadas com o HPV ainda não está claro. Oliveira *et al.*, 2003 sugerem que a presença do HPV em mucosa oral normal deve ser considerada comum e que poderiam levar à infecções latentes e/ou subclínicas com baixo número de cópias virais.

Kojima e colaboradores (2002) pesquisaram em amostras parafinadas a presença do HPV 38 por meio da PCR. Encontraram uma prevalência alta (66%) do vírus em suas amostras, mas observaram que para pacientes acima de 60 anos a prevalência foi baixa (56.7%) quando comparado com pacientes mais jovens (78.3%). Eles sugerem um possível papel do HPV na transformação maligna e que a presença do vírus pode ter papel importante em grupos mais jovens. Ainda, Lee *et al.*, (2008) justificam, em parte, a baixa frequência de HPV encontrada em sua amostra (10%) à média de idade dos pacientes de sua amostra (64 anos) inferindo que esta taxa poderia ser maior se a faixa etária dos pacientes fosse mais baixa. No nosso estudo, entretanto, encontramos maior frequência do vírus em pacientes mais idosos. Nove das onze amostras (81,8%) positivas para o vírus HPV no grupo de caso em nosso estudo estão presentes em pacientes da sexta até a nona década de vida. Por outro lado, Tachezy *et al.*, (2005) não encontraram relação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e a idade dos pacientes.

Algumas limitações devem ser levadas em consideração no presente estudo: o tamanho da amostra, o não questionamento sobre comportamento sexual, bem como a idade do primeiro ato sexual e o número de parceiros dos participantes. Estes dados seriam importantes para tentar estabelecer a relação entre estas variáveis e a presença do HPV na mucosa bucal. Além disso, não obtivemos dados relativos à sobrevida e prognóstico dos pacientes da pesquisa e, portanto, não pudemos relacionar a presença do vírus com estas variáveis. Ademais, o uso de mucosa oral esfoliada para obtenção das amostras tem como vantagem a utilização de uma técnica não invasiva de coleta de amostras. Todavia, coleta apenas células superficiais que favorecem apenas a detecção de infecções virais produtivas. Neste sentido, o uso de biópsias para o grupo controle poderia ser admitido como ideal, já que proporcionaria uma amostragem do epitélio contendo a camada basal, na qual infecções latentes ou subclínicas poderiam estar presentes. Não obstante, teria como limitação a natureza invasiva do procedimento, constituindo-se, a primeira vista, em impecilho à adesão dos pacientes controles ao estudo. Da mesma

forma, restringe a área de investigação ao tamanho dos tecidos obtidos, podendo não se constituir na área de infecção viral.

Finalmente, algumas questões poderiam ser consideradas para investigações futuras, visando dar mais visibilidade aos achados e aos fatores que poderiam interferir na detecção do HPV e na análise de sua associação com o câncer bucal, a saber:

1. Considerando a investigação epidemiológica para verificar associação entre HPV e câncer bucal, o estudo caso-controle deveria ser o desenho recomendável, mais ajustável ao estabelecimento de comparações de freqüência entre população com e sem doença. O pareamento poderia ser realizado de diferentes formas, considerando uma ou mais variáveis, atentando para verificar uma análise que contemple investigar diferentes tipos de variáveis que potencialmente seriam variáveis de confundimento (Schelesselman & Stolley, 1982).

2. Utilizar técnicas de detecção que associem maior sensibilidade e maior especificidade. A PCR seria neste caso a mais recomendável.

3. Considerar a possibilidade de obter um maior número de casos, considerando as diferentes topografias para que se possa fazer uma estratificação mais representativa dos tumores segundo a localização.

4. Tentar se possível, amostrar mais material dos casos, considerando vários fragmentos do tumor para avaliar se diferentes áreas dos tumores poderiam expressar diferenças quando a presença do HPV.

5. Abordagem utilizando uma combinação de técnicas para verificar na mesma amostra a presença e a constatação do vírus nas células neoplásicas, por meio de PCR e hibridização in situ ou imunohistoquímica.

6. Atentar para a melhor preservação possível do material coletado, em especial quanto a esterilização do material na coleta da lesão, a individualização do material cirúrgico para manipulação dos fragmentos (dissecação da lesão), a fim de impedir contaminação cruzada de amostras.

7. Realizar os experimentos em duplicata com objetivo de dar maior confiabilidade nos resultados obtidos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que quando consideramos um grupo heterogêneo de CEB (cancer bucal, lingual e orofaríngeo), a frequência de detecção foi relativamente pequena (22,0%), o que foi compatível com outros estudos brasileiros.

Maior frequência de HPV foi identificada quando apenas os casos de tumores orofaríngeos foram considerados. Neste caso, a frequência foi elevada para 40%. Este está coerente com o que tem sido observado na literatura mundial. Não foi possível identificar HPV em nenhum caso dos tumores labiais.

Foram identificados dois tipos de HPV de alto risco nos CEB, a saber: 16 e 31; os tipos de baixo risco identificados foram: 6, 44, 54, 55. Comparando com a amostra controle, não foi possível estabelecer associação estatisticamente significativa entre HPV e câncer, seja quando analisados com grupo, como de baixo e alto risco ou como infecção múltipla. Apenas a exposição aos produtos do álcool foram considerados associados estatisticamente aos casos de CEB. Da mesma forma, não foi possível identificar nenhuma associação entre as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos CEB e a presença do vírus HPV.

Os resultados observados sugerem que o HPV pode não ser um fator causal independente para o desenvolvimento do CEB, embora não se possa excluir o seu papel no processo de carcinogênese bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbey LM, Page DG, Sawyer DR. The clinical and histopathologic features of a series of 464 oral squamous cell papillomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1980;49(5):419-28.

Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. **Oral Microbiol Immunol.** 2008;23(4):271-4.

Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. **Arch Med Res.** 2008;39(2):189-97.

Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. **Oral Oncol.** 2009;45(6):486-91.

Applebaum KM, Furniss CS, Zeca A, Posner MR, Smith JF, Bryan J *et al.* Lack of association of alcohol and tobacco with HPV-16-associated head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1801-10.

Archard HO, Heck JW, Stanley HR. Focal Epithelial Hyperplasia: an Unusual Oral Mucosal Lesion Found in Indian Children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1965;20:201-12.

Bagan J., Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. **Oral Oncol.** 2008; 44(2):103-8

Barnes et al. **World Health Organization Classification of Tumours Head and Neck Tumours**. IARC, 2005.

Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. **Annu Rev Biochem**. 2006;75:189-210.

Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. **Clin Cancer Res**. 2005;11(8):2862-7.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst**. 1995;87(11):796-802.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. **Adv Cancer Res**. 1996;69:135-74.

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 agent or contamination? **J Oral Pathol Med**. 2006; 35:86-90.

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):720-727.

Brazil: Ministry of Health. Estimate 2008, Brazilian cancer incidence. Rio de Janeiro: National Cancer Institute (INCA); 2008.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev.** 2003;16(1):1-17.

Cagliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. 2005; 204.

Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). **Int J Oncol.** 2007;30(4):813-23.

Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Res.** 2002;89(2):191-9.

Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2006;72(2):272-82.

Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. **J Biosci.** 2003;28(3):337-48.

Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, Karja J, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Arch Dermatol Res.** 1990;282(8):493-7.

Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1992;89(10):4549-53.

Chen W, Li F, Mead L, White H, Walker J, Ingram DA, et al. Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior. **Virology**. 2007;367(1):168-74.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1992;89(13):5799-803.

Chiba I, Shindoh M, Yasuda M, Yamazaki Y, Amemiya A, Sato Y, et al. Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Oncogene**. 1996;12(8):1663-8.

Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. **Intervirology**. 1994;37(3-4):150-8.

Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. **Nature**. 1993;362(6423):849-52.

Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. **J. Virol**. 1993; 67:6170–6178.

Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. **Oral Dis.** 2004;10(3):163-6.

Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PM, de Freitas SE, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet.** 2004;150(1):44-9.

Culp TD, Budgeon LR, and Christensen ND. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. **Virology.** 2006; 347:147–159.

Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. **J Virol.** 2006;80(18):8940-50.

da Silva CE, da Silva ID, Cerri A, Weckx LL. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007;104(4):497-500.

Day PM, Thompson CD, Buck CB, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. **J Virol.** 2007;81(16):8784-92.

Dekmezian RH, Batsakis JG, Goepfert H. In situ hybridization of papillomavirus DNA in head and neck squamous cell carcinomas. **Arch Otolaryngol. Head and Neck Surg.** 1997; (113):819-821.

Doerfler W. DNA methylation: eukaryotic defense against the transcription of foreign genes? **Microb Pathog.** 1992;12(1):1-8.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature.** 1991;352(6338):824-7.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med.** 2007;356(19):1944-56.

Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol.** 1997;15(2):181-98.

Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **J Virol.** 2003;77(5):2819-31.

Fornatora M, Jones AC, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1996;82(1):47-56.

Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, Guily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. **Arch Otolaryngol Head and Neck Surg.** 1997; (123):513-516.

Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de 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.

Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Applebaum KM, Nelson HH, et al. Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. **Ann Oncol.** 2009;20(3):534-41.

Gallegos-Hernández JF, Paredes-Hernández E, Flores-Díaz R, Minauro-Munõz G, *et al.*. Human papillomavírus: association with head and neck câncer. **Cir cir.** 2007; 75(3):151-155.

Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. **Am J Dermatopathol.** 1991;13(4):386-95.

Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. **Arch Virol.** 2006;151(12):2321-35.

Genther SM, Sterling S, Duensing S, Munger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **J Virol.** 2003;77(5):2832-42.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst.** 2000;92(9):709-20.

Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst.** 2008;100(6):407-20.

Gonzalez JV, Gutierrez RA, Keszler A, Colacino Mdel C, Alonio LV, Teyssie AR, et al. Human papillomavirus in oral lesions. **Medicina (B Aires).** 2007;67(4):363-8.

Goulart LR, Vieira GS, Inácio J, Goulart IMB. Método para a tipagem, determinação da dominância viral e quantificação relativa do papilomavírus humano que utiliza uma combinação de técnicas moleculares, oligonucleotídeos e compostos. PI-0302987, 18/07/2003.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol.** 2000;38(1):357-61.

Gruenberg J, van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2006;7(7):495-504.

Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2004;15(4):188-96.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, 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.

IARC - World Health Organization. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenesis risks to humans. v.90. Human Papillomaviruses., 2007.

Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2005;99(3):311-5.

Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, Adler-Storthz K, Dahlstrom KR, Schiller JT, et al. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. **Carcinogenesis**. 2008;29(4):875-9.

Jones, HJ. Non-odontogenic oral tumors in children. **Br. Dent J.** 1965; 16:439-447.

Kingsley K, Johnson D, O'Malley S. Transfection of oral squamous cell carcinoma with human papillomavirus-16 induces proliferative and morphological changes in vitro. **Cancer Cell Int.** 2006;6:14.

Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, et al. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2008;265 Suppl 1:S75-82.

Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.** 2002;38(6):591-6.

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; 63:1245-1261.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2005;14(2):467-75.

Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. **Am J Surg Pathol.** 1993 Feb;17(2):133-45.

Lee WT, Tubbs RR, Teker AM, Scharpf J, Strome M, Wood B *et al.* Use of in situ Hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. **Arch Patol Lab Med.** 2008; 132:1653-56.

Lim KP, Hamid S, Lau SH, Teo SH, Cheong SC. HPV infection and the alterations of the pRB pathway in oral carcinogenesis. **Oncol Rep.** 2007;17(6):1321-6.

Liu WK, Chu YL, Zhang F, Chen P. *et al.* The relationship between HPV16 and expression of CD44v6, nm23H1 in esophageal squamous cell carcinoma. **Arch Virol.** 2005;150:991-1001.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2004;68(2):362-72.

Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. **Oncogene.** 2000;19(40):4611-20.

Lorinez AT, Reid R, Jenson AB, Geenberg MD, Landcaster W, Kurman RJ. Human Papillomavirus infection of cervix relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstetric and Gynecology.** 1992; (79):328-337.

Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2007;36(2):153-8.

Madinier I, Monteil RA. Human papillomaviruses in oral epithelial lesions. Comparative study between histopathology and immunohistochemistry in routine diagnosis. **J. Biol Buccale**. 1987; 15(2): 105-10.

Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. **Cell**. 2006; 124: 729–740.

Mazon RC. **Papilomavirus humano (HPV) e carcinogênese de mucosa oral: avaliação imunohistoquímica das proteínas p27, mdm2 e catepsina B**. [dissertação], Araraquara:Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP; 2007.

McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. **Head Neck**. 1998;20(3):250-65.

Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. **Int J Cancer**. 2000;89(3):300-4.

Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg**. 1998;176(5):428-9.

Miller CS, White DK, Ky L. Human papillomavirus in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature. **Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1996; 82(1): 57-68.

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.

Mitsuishi T, Ohara K, Kawashima M, Kobayashi S, Kawana S. Prevalence of human papillomavirus DNA sequences in verrucous carcinoma of the lip: genomic and therapeutic approaches. **Cancer Lett.** 2005;222(2):139-43.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med.** 2003;348(6):518-27.

Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine.** 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.

Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. **Oral Dis.** 2005;11(6):350-9.

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):41-46.

Oliveira MC, Soares RC, Pinto PL, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol** 2003; 69(4):153-9.

Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Souza LB, Medeiros SRB, Costa ALL. High-risk papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Auris Nasus Larynx.** 2008; doi:10.1016/j.anl.2008.10.011

Padayachee A. Human papillomavirus (HPV) types 2 and 57 in oral verrucae demonstrated by in situ hybridization. **J Oral Pathol Med.** 1994;23(9):413-7.

Pan HY, Zhang ZY, Zhou XJ, Li J, He RG, Chen WT. [The establishment of a carcinogenesis model of oral squamous cell carcinoma in vitro]. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**. 2006;41(1):20-4.

Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**. 2002; 3:311–320.

Picksley SM, Lane DP. p53 and Rb: their cellular roles. **Curr Opin Cell Biol**. 1994;6(6):853-8.

Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. **Oral Oncol**. 2008;44(3):242-50.

Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat Clin Pract Oncol**. 2008;5(1):24-31.

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathog**. 2009;5(2):e1000318.

Reid R, Campion MJ. The biology and significance of human papillomavirus infections in the genital tract. **Yale J Biol Med**. 1988;61(4):307-25.

Reid R, Campion MJ. Human Papillomavirus associated lesions of the cervix biology and colposcopic features. **Cleir. Obstet Gynecol**. 1989; 32:157-179.

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**. 2003;104(3):336-44.

Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Braz Oral Res.** 2006;20(1):21-4.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. **Virology.** 1993;197(1):176-87.

Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Ruback MJC, Bonilha JL, Fernandes AM *et al.* The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in the Brazilian population. **Journal of Medical Virology.** 2006; 78: 614-618.

Schock RK. Familial focal epithelial hyperplasia. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1969;28(4):598-602.

Schleselman JJ and Stolley PD. **Case-control Study: design, conduct, analysis.** New York: Oxford, University Press, 1982.

Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. **J Oral Pathol Med.** 2008;37(10):593-8.

Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. **Int J Cancer.** 2007;120(4):825-32.

Smith JL, Campos SK, Wandinger-Ness A, Ozbun MA. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. **J Virol.** 2008;82(19):9505-12.

Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. **Cancer Res.** 1997;57(7):1294-300.

Soares CP, Malavazi I, dos Reis RI, Neves KA, Zuanon JA, Benatti Neto C, et al. [Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions]. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2002;35(5):439-44.

Soares RC, Oliveira MC, Souza LB, Costa AL, Medeiros SR, Pinto LP. Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. **Am J Otolaryngol.** 2007;28(6):397-400.

Soares RC, Oliveira MC, de Souza LB, Costa Ade L, Pinto LP. Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients. **J Appl Oral Sci.** 2008;16(5):340-4.

Sotlar K, Diemer D, Delthleffs A, Hack Y, Stuber A, Vollmer N *et al.* Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested Multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology.** 2004; 42.7:3176-3184

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum Pathol.** 1992;23(2):117-28.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003;95(5):594-600.

Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Higashikawa K, et al. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 2007;45(2):116-22.

Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int J Oral Surg.** 1983;12(6):418-24.

Syrjanen SM. Basics concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infection. Review article. **APMIS** 1990; 98:95-110.

Tachezy R, Klozar J, Salakova M, Smith E, Turek L, Betka J, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. **Oral Dis.** 2005;11(3):181-5.

Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. **Clin Cancer Res.** 2007;13(9):2568-76.

Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). **Ann Oncol.** 2008;19(10):1681-90.

Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Optiz OG, Suliman Y et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2002; 13:51-61.

Tommasino M, Crawford L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. **Bioessays**. 1995; 17(6):509-18.

Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. **Oncogene**. 2004;23(17):2988-95.

Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, Roberts S. The full-length E1^{E4} protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. **Virology**. 2007; 362: 453-460.

Woods K, Shillito E, Spitz M, Schantz S, Adler-Stortz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathology Med**. 1993; (22):101-108.

Wunsch-Filho V. The epidemiology of the oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol**. 2002;38: 737-746.

Xavier SD, Bussoloti Filho I, Lancellotti CL. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. **Braz J Otorhinolaryngol**. 2005;71(4):510-4.

Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, Nakamura H, Sakai H. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. **J Virol**. 2008;82(17):8820-7.

Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2004;33(1):71-4.

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**. 1996;1288(2):F55-78.

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A área de Patologia Bucal do Programa de Pós Graduação em Odontologia, juntamente com o Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo geneético relacionado ao Câncer de Boca. Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Detecção de HPV em Carcinoma Epidermóide Bucal: Estudo Caso-Controlle”**, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Prof. Dr. Adriano Motta Loyola e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

O projeto refere-se ao estudo da Biologia Molecular das amostras da boca e na possível associação do câncer de boca com o vírus HPV, podendo gerar benefícios para melhorar o diagnóstico, tratamento e sobrevida dos pacientes com essa doença, no futuro.

Para realização dos exames laboratoriais, será necessária a coleta de fragmentos das lesões após o procedimento cirúrgico. Esse será realizado conforme recomendação clínica e não será de forma alguma alterado para a realização desta pesquisa. Não haverá, portanto, risco ao paciente, a não ser os que normalmente podem acontecer em pacientes operados. O material coletado será enviado ao Laboratório de Geneética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de DNA.

A responsável pela coleta do material será a aluna Taís Alves dos Reis. Esta também ficará responsável pela aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e de um questionário, ambos antes dos procedimentos cirúrgicos.

Os resultados da pesquisa serão publicados, mas, em nenhum momento as pessoas que participarem da pesquisa serão identificadas. Não haverá gasto financeiro para quem aceitar participar, nem direito a pagamento pela sua participação.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultado dos exames realizados. Informações adicionais poderão ser obtidas no seguinte endereço: Av. Pará, 1720, Bl 2N, Sala 07 - Telefones: 3218-2703 / 3218-2478.

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura

Ética em Pesquisa (CEP/UFU) – Fone: 3239-4531

Anexo 2
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para os pacientes do grupo controle)

A área de Patologia Bucal do Programa de Pós Graduação em Odontologia, juntamente com o Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo geneético relacionado ao Câncer de Boca. Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Detecção de HPV em Carcinoma Epidermóide Bucal: Estudo Caso-Controlle”**, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

O projeto refere-se ao estudo da Biologia Molecular das amostras da boca e na possível associação do câncer de boca com o vírus HPV, podendo gerar benefícios para melhorar o diagnóstico, tratamento e sobrevida dos pacientes com essa doença, no futuro.

Para realização dos exames laboratoriais será necessária a coleta de raspados bucais, procedimento seguro que não traz risco significativo para o paciente, que será realizado por profissional experiente da equipe de pesquisadores, cujo nome está escrito abaixo. O material coletado será enviado ao Laboratório de Geneética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de DNA.

A responsável pela coleta do material será a aluna Taís Alves dos Reis. Esta também ficará responsável pela aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e de um questionário, ambos antes do procedimento de raspagem bucal.

Os resultados da pesquisa serão publicados, mas, em nenhum momento as pessoas que participarem da pesquisa serão identificadas. Não haverá gasto financeiro para quem aceitar participar, nem direito a pagamento pela sua participação.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultado dos exames realizados. Informações adicionais poderão ser obtidas no seguinte endereço: Av. Pará, 1720, Bl 2N, Sala 07 - Telefone: 3218-2703 / 3218-2478.

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura

Anexo 3
Questionário

Código de identificação do paciente: _____

2) Idade: _____ 3) Sexo: _____

4) Estado civil: _____

5) Fumante: ☐ não ☐ sim Há quanto tempo e com que frequência?

n. de cigarros (ou outro tipo): _____

6) Faz uso de bebidas alcoólicas? : ☐ não ☐ sim Há quanto tempo e com que frequência? _____

Tipo e dose (copos ou garrafa) _____

Se não fuma ou bebe: quantidade de consumo e por quanto tempo _____

Qual o tempo que já não faz uso (fumo ou bebida alcoólica) _____

7) Há quanto tempo percebeu a presença da lesão na sua boca? _____

8) Houve alguma mudança na boca após perceber a lesão? (Como por exemplo, aumento da quantidade de saliva.) _____

9) Sentia algum incômodo que se relacionava à lesão? Foi observada a presença de íngua? _____

10) Com exceção desta, alguma outra lesão relevante em outras partes do corpo foi observada em você ou na sua parceira? _____

Se sim, existe algum exame que possa nos informar qual a origem (etiologia) da mesma? _____

11) Faz uso de prótese removível? Há quanto tempo esta foi confeccionada?

12) Existe alguém na família que já apresentou lesão (ões) parecida (s) com essa?

Anexo 4

Questionário (para os pacientes do grupo controle)

1) Código de identificação do paciente: _____

2) Idade: _____ 3) Sexo: _____

4) Estado civil: _____

5) Fumante: ☐ não ☐ sim Há quanto tempo e com que frequência?

6) Faz uso de bebidas alcoólicas? : ☐ não ☐ sim Há quanto tempo e com que frequência? _____

Dose, frequência, tempo de uso de fumo e álcool: _____

PARA OS QUE PARARAM:

Tempo de dependência, quantidade (n. de cigarros/dia) _____

Tempo de dependência, dose/dia) _____

Quanto tempo de abstinência _____

7) Tem o costume de examinar a boca e fazer visitas regulares ao dentista? Com que frequência? _____

8) Nunca percebeu nenhuma lesão na boca? _____

9) Existe alguma lesão relevante em outras partes do corpo em você ou na sua parceira? _____

Se sim, existe algum exame que possa nos informar qual a origem (etiologia) da mesma? _____

10) Faz uso de prótese removível? Há quanto tempo esta foi confeccionada?
