

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Myrian Christina Corrêa da Camara Hewson Brew

**ESTUDO MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM LESÕES DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL**

Porto Alegre
Abril, 2009

Myrian Christina Corrêa da Camara Hewson Brew

**ESTUDO MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM LESÕES DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora : Prof^a Dr^a Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre
Abril, 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B847e Brew, Myrian Christina Corrêa da Camara Hewson
Estudo molecular de papilomavírus humano em lesões de carcinoma espinocelular bucal. / Myrian Camara Brew. – Porto Alegre, 2009.
80 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS.

Orientadora: Prof^a Dr^a Virgínia Minghelli Schmitt

1. Biologia Celular. 2. Biologia Molecular.
3. Papilomavírus Humano. 4. Cancer Oral. I. Título.

CDD 574.88

Bibliotecária Responsável

Anamaria Ferreira
CRB 10/1494

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Virgínia Minghelli Schmitt, por ter aceitado a experiência de orientar uma verdadeira novata na área da biologia celular e molecular. Foi um longo percurso que hoje completamos.

À amiga Rita Trapp, por ter dedicado um tempo infinito na bancada do laboratório a meu trabalho. Não tenho palavras para agradecer tua total disponibilidade e apoio.

A toda equipe do Serviço de Estomatologia da PUCRS, em especial à Profª Drª Liliane Yurgel, que foram fundamentais na coleta das amostras para esta pesquisa e que sempre me incentivaram na conclusão deste estudo.

Ao Serviço de Estomatologia da ULBRA, na pessoa do Prof Dr Sérgio Q. Miguens Junior, pela ajuda prestada nos momentos finais desta pesquisa.

À Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Curso de Odontologia, que permitiu minhas ausências para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu grande amigo Prof Dr Pedro González Hernández, por ter estado sempre ao meu lado e me incentivado em todas as etapas de minha vida acadêmica.

Aos colegas das disciplinas em que leciono na ULBRA, por terem me substituído todas as vezes que foram necessárias, e foram muitas. Hoje, saio desta fase sabendo que tenho, mais do que colegas, bons amigos.

À amiga Prof^a Dr^a Vania Fontanella, pela paciência e pelo apoio dados nas fases finais deste estudo.

À amiga Prof^a Dr^a Juliana Balbinot Hilgert, pela ajuda na análise estatística dos resultados.

À amiga Mariana Magalhães, por ter estado presente no início desta caminhada. Obrigada por tua dedicação.

A toda equipe do laboratório de Biologia Molecular, coordenado pela Prof^a Dr^a Virgínia Minghelli Schmitt, que participou de modo direto ou indireto na realização das análises necessárias neste estudo.

Ao Dr. José Eduardo Levi e a sua equipe, Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, pela colaboração prestada na fase laboratorial desta pesquisa.

Às secretárias Luisa Moreira e Catia Bonacina, por estarem sempre disponíveis, serem competentes e extremamente gentis em todos os momentos acadêmicos.

À minha família, por estarem presentes e me apoiarem em todas as etapas de minha vida. Minhas ausências são muitas nesses momentos, mas a paciência e o amor de vocês são meu maior incentivo e a minha certeza de sempre ir em frente. Vocês são minha vida.

RESUMO

O câncer bucal atinge cerca de 7% da população mundial, sendo um importante problema de saúde pública, tanto pelas seqüelas apresentadas pelos pacientes, como pelos custos envolvidos com o seu tratamento. Entre os cânceres da cavidade bucal, 95% são representados pelo carcinoma espinocelular bucal (CECB). Estudos têm mostrado que esse tumor ocorre preferencialmente em homens com mais de 40 anos, de pele branca, que apresentam os fatores de risco tradicionais, principalmente o uso de tabaco e/ou de álcool e a exposição aos raios solares. Todavia, a literatura demonstra o desenvolvimento do CECB em pacientes que não apresentavam exposição aos fatores de risco acima citados, tendo sido sugerida a associação com o papilomavírus humano (HPV). Apesar de ser um importante vírus oncogênico, o papel do HPV na carcinogênese bucal ainda é controverso. O objetivo deste estudo foi detectar e tipar o HPV e verificar sua associação com a exposição ao tabaco e ao álcool em uma população do Rio Grande do Sul/Brasil. Dezesete amostras de tecido fresco congelado foram obtidas de biópsias de CECB. O ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV foi extraído por meio de método padrão que utiliza proteinase K. Para testar a viabilidade do DNA extraído, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da β -globina humana. A pesquisa molecular de HPV foi realizada utilizando os testes comerciais da Roche AMPLICOR (AMP) e LINEAR ARRAY (LA) HPV. Os resultados mostraram que 76,5% da população estudada eram do gênero masculino, com idade média de 61,71 ($\pm 12,96$), 29,4% dos indivíduos não fumavam e 29,4% pertenciam ao grupo dos que não bebiam. O DNA do HPV foi detectado em 47,1% dos casos de CECB. Em todas as 8 amostras positivas, foi identificado o HPV 16, 75% (6/8) dos tumores foram diagnosticados histologicamente como moderadamente diferenciados e 37,5% (3/8) estavam localizados no assoalho da boca. Nenhuma associação foi observada entre a infecção por HPV e a exposição ao tabaco ou ao álcool. O estudo encontrou uma prevalência consideravelmente alta de infecção por HPV 16 nas lesões de CECB (aproximadamente a metade), suportando a possibilidade de um possível papel do HPV na carcinogênese bucal.

Palavras chave: Carcinoma de Células Escamosas. Boca. Sondas DNA HPV.

ABSTRACT

Oral cancer affects approximately 7% of the population worldwide, representing an important public health problem especially when considering the serious consequences for the patients and the high costs of treatment. Among oral cavity cancers, 95% are oral squamous cell carcinoma (OSCC). Studies have shown that this tumor is more frequent in white males over 40 years of age, chronically exposed to risk factors associated with cancer, mainly tobacco and/or alcohol and sun exposure. However, literature demonstrates the development of OSCC in patients never exposed to the above mentioned risk factors, being suggested an association with human papillomavirus (HPV). Despite being an important oncogenic virus, the role of HPV in oral carcinogenesis is still controversial. The aim of this study was to detect and type HPV and verify its association with tobacco and alcohol exposure in OSCC in Rio Grande do Sul/Brazil. Seventeen fresh frozen tissue samples were obtained from biopsies of OSCC. Deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated by standard proteinase K protocol. For DNA viability testing, samples were submitted to a polymerase chain reaction (PCR) for human β -globin gene. We analyzed HPV-DNA using the commercially manufactured PCR-based Roche AMPLICOR (AMP) and LINEAR ARRAY (LA) HPV tests. Results showed that 76.5% of the population were male, age mean was 61.71 (\pm 12.96), 29.4% were classified as never-smokers and 29.4% as never-drinkers. HPV-DNA was detected in 47.1% of the OSCC cases. In all 8 positive samples HPV 16 was present, one coinfection with HPV 18 and one with HPV 33, 75% (6/8) were histologically diagnosed as moderately differentiated OSCC and 37.5% (3/8) were located in the floor of the mouth. No association was observed between HPV infection and tobacco or alcohol exposure. We observed a considerably high prevalence of HPV 16 infection in OSCC lesions, supporting the possible role of HPV in oral carcinogenesis, but further studies are required.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell. Mouth. DNA Probes, HPV.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucléico

CEC – carcinoma espinocelular

CECB – carcinoma espinocelular bucal

cm – centímetros

E – *early* – região precoce

HPV – *human papillomavirus*; papilomavírus humano

HR-HPV – *high risk* HPV; HPV de alto risco

IHC - imunohistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISH – *in situ hybridization*; hidridização *in situ*

L – *late* – região tardia

LCR – *long control region*; região regulatória longa

LR-HPV – *low risk* HPV; HPV de baixo risco

µL – microlitros

nm - nanômetro

nPCR – *nested* PCR

ORF – *open reading frames*; fase ou banda aberta de leitura

OSCC – *oral squamous cell carcinoma*; carcinoma espinocelular bucal

PCR – *polymerase chain reaction*; reação em cadeia da polimerase

pRb – proteína retinoblastoma

RT-PCR – *real time* -PCR; PCR em tempo real

SCC – *squamous cell carcinoma*; carcinoma espinocelular

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Table 1 Distribution of study subjects according to selected characteristics.....	43
Table 2 Distribution of study subjects according to HPV status	45
Table 3 Socio-demographic characteristics, tumor information and HPV Type for to all HPV-positive patients.....	46
Quadro 1 Prevalência de HPV em carcinoma espinocelular em estudos da literatura.....	51

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	09
1.1 INTRODUÇÃO	09
1.1.1 Carcinoma Espinocelular Bucal.....	12
1.1.2 Papilomavírus Humano.....	14
1.1.3 Papilomavírus Humano e Carcinoma Espinocelular Bucal	17
1.2 OBJETIVOS	27
1.2.1 Objetivo Geral	27
1.2.2 Objetivos Específicos	27
1.3 HIPÓTESE	27
CAPÍTULO 2 ARTIGO	28
CAPÍTULO 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	47
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
3.2 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	71
APÊNDICE	78

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde estimou para o ano de 2008, no Brasil, o surgimento de 351.720 casos novos de câncer, sendo, nos homens, principalmente por neoplasia de próstata e de pulmão e, nas mulheres, por neoplasia de mama e de colo uterino (à exceção de pele não melanoma). No que diz respeito ao câncer bucal, estima-se que ocorrerão 10.380 casos novos em homens e 3.780 em mulheres, dos quais 1.050 provavelmente na região Sul do país, atingindo 14,97% dos homens e 3,96% das mulheres (BRASIL, 2008).

De acordo com a Classificação Internacional das Doenças (*International Classification of Diseases, Tenth Revision [ICD-10]*), o câncer bucal refere-se a um subgrupo de alterações malignas da cabeça e do pescoço que se desenvolvem nos lábios, língua, glândulas salivares, gengiva, assoalho da boca, orofaringe, superfícies bucais e outras localizações intrabucais. Todavia, o termo tem sido utilizado como sinônimo de carcinoma espinocelular (CEC) de origem na mucosa bucal, representando cerca de 90-95% de todas as alterações presentes nos sítios anteriormente mencionados. A Organização Mundial da Saúde apresenta o CEC como o 6º câncer mais prevalente no mundo, com incidência bastante variável nas diferentes regiões, apresentado a maior prevalência no sudeste asiático e na Índia (CHANG et al., 1990; CHANG et al., 1991; LAKSHMI; NAIR; PILLAI, 1993; LA VECCHIA et al., 1997; TSANTOULIS et al., 2007; BRASIL, 2008).

A etiologia do carcinoma espinocelular bucal (CECB) é bastante complexa, estando associada a diversos fatores como tabaco e/ou álcool, exposição crônica ao sol, infecções por vírus e componente familiar. Apesar de o tabaco e o álcool serem fatores independentes, sua associação aumenta consideravelmente o risco de o indivíduo desenvolver esse tipo de lesão (ORD; BLANCHAERT, 2000; OLIVEIRA; ODELL, 2000; SCIUBBA, 2001; TSANTOULIS et al., 2007). Sundfeld (1999) observou, em seu estudo, que cerca de 12% dos pacientes que apresentavam CECB não fumavam e 18% não bebiam. Dahlstrom et al. (2008), em um estudo epidemiológico prospectivo com 172 pacientes que nunca fumaram ou beberam e

com 1131 pacientes que fumaram e beberam, observaram que o primeiro grupo era preferencialmente composto por mulheres e que estas apresentaram uma proporção mais elevada de câncer da cavidade bucal e da orofaringe. Tais observações sugeriram que, além dos fatores clássicos, outros poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento do tumor.

Entre os outros fatores relacionados com o CECB estão as imunodepressões, os componentes da dieta, as infecções fúngicas e, conforme apontam algumas pesquisas, a presença de alguns vírus, em especial o papilomavírus humano (HPV) (COX; SCULLY; MAITLAND, 1991; MILLER; WHITE, 1996; MCGLENNEN, 2000; SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000; MILLER; JOHNSTONE, 2001; HERRERO, 2003; HERRERO et al., 2003; HA; CALIFANO, 2004; SCHIFFMAN et al., 2005; SYRJÄNEN, 2005; LI, STURGIS, 2006; FURNISS et al., 2007; TERMINE, 2008).

O papel do HPV na carcinogênese cervical já está bem estabelecido na literatura (zur HAUSEN, 2000). Devido à semelhança entre a mucosa do colo uterino e a mucosa bucal, foi sugerida a possibilidade da associação do HPV com a carcinogênese bucal, especificamente nas lesões de CECB (SYRJÄNEN et al., 1983a; SYRJÄNEN et al., 1983b; SYRJÄNEN et al., 1983c; SYRJÄNEN et al., 1987). O mecanismo molecular do HPV de indução à carcinogênese envolve especialmente as oncoproteínas E6 e E7. A expressão dessas proteínas virais na mucosa bucal infectada por HPV poderia contribuir para o desenvolvimento do CECB (PERRONE e PREMOLI-DE-PERCOCO, 1992; ARRAND; HARPER, 1998; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998; HA; CALIFANO, 2004; LI; STURGIS, 2006; MADKAN et al., 2007).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar o papel do HPV na carcinogênese do CECB. Os resultados desses estudos apontam o HPV 16 e o HPV 18 como os mais frequentes nas amostras estudadas (WATTS; BREWER; FRY, 1991; YEUDALL; CAMPO, 1991; NAIR; PILLAI, 2005; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). Todavia, apresentam uma grande variabilidade na prevalência, variando de 0% até 100%. Um estudo realizado por Miller e White (1996) observou uma maior detecção do DNA viral em amostras congeladas (51,6% - 115 de 223) do que em amostras embebidas em parafina (21,7% - 136 de 628), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). As causas mais prováveis para essas discrepâncias nos valores, segundo os autores, estariam relacionadas com a metodologia utilizada nos estudos, existindo uma diferença significativa nos achados

de HPV entre amostras provenientes de biópsia fresca congelada ou de bloco de parafina da lesão.

Segundo Smith et al. (2004a), um aspecto metodológico importante é o cuidado em utilizar somente tecido alterado para a análise molecular, eliminando o tecido normal circunvizinho, passo que permitiria afirmar que o DNA viral estaria presente nas células do tumor e não nas células da mucosa normal circunvizinha. Todavia, os estudos presentes na literatura não deixam claro em sua metodologia o cuidado de analisar exclusivamente o tecido alterado.

O ensaio utilizado para detecção do HPV também é um fator importante a ser considerado, pois diferentes técnicas apresentam diferentes sensibilidades. Os estudos de Frazer et al. (1993), de Miller e White (1996) e de Miller e Johnstone (2001), comparando a reação em cadeia da polimerase (PCR), a hibridização *in situ* (ISH) e a imunohistoquímica (IHC) para detecção de HPV em material de biópsia congelado e blocos parafinados, concluíram que a detecção era mais eficiente no tecido congelado e que a PCR foi mais sensível que as demais. Segundo Carmo e Fiorine (2007), a técnica da PCR apresenta maior sensibilidade, especificidade e velocidade de análise, sendo o método molecular de escolha mais eficiente para o diagnóstico do HPV.

Desde os anos 80, tem havido uma preocupação com a padronização de métodos laboratoriais para a detecção e tipificação dos HPVs nas lesões por eles infectadas. Tal procedimento é um passo importante no monitoramento temporal e idade-associado frente às mudanças de prevalência dos vários tipos de HPV já identificados. Além disso, permitiria o desenvolvimento de vacinas para os HPV predominantes na população (WOO et al., 2007; STEINAU et al., 2008). A indústria tem desenvolvido sistemas de detecção e tipificação do DNA viral com maior sensibilidade e especificidade. A diferença entre os sistemas desenvolvidos está na sua sensibilidade e na sua capacidade de detectar todos os genótipos de HPV oncogênicos (HUBBARD, 2003; STEVENS et al., 2007; DALSTEIN et al., 2008). São exemplos comerciais o *PapilloCheck test*, *Digene HPV Test*, *Roche Molecular Systems*.

Nos últimos 40 anos, tem-se observado uma marcada diminuição mundial no consumo de tabaco e álcool, principais fatores de risco associados ao CECB. Ainda, 15-20% dos pacientes com diagnóstico para CEC da cabeça e pescoço não apresentam história de tabaco ou álcool. Todavia, tem havido um aumento da

incidência do CEC, principalmente na língua, e em pacientes cada vez mais jovens (PETRINI et al., 2006; LIANG, et al., 2008).

1.1.1 Carcinoma espinocelular bucal

O carcinoma espinocelular bucal (CECB), também conhecido como de células escamosas ou epidermóide, representa cerca de 90-95% das neoplasias malignas da cavidade bucal. Caracteriza-se clinicamente por ser uma lesão úlcero-vegetante de bordas elevadas e com base endurecida, localmente agressiva, podendo apresentar diferenças de acordo com a localização. Essa lesão tem por localização preferencial o lábio inferior (38%), a língua (22%) e o assoalho da boca (17%). Os demais 23% distribuem-se nas gengivas, no palato, nas tonsilas, no lábio superior, na mucosa jugal e na úvula (SYRJÄNEN, 2003; PETRINI et al., 2006).

O desenvolvimento e a progressão do câncer bucal apresentam, principalmente, dois fatores de controle iniciais. O primeiro é a hiperproliferação das células, que pode não ser obrigatória. O segundo e essencial fator para sua ocorrência é o desenvolvimento de uma instabilidade genética caracterizada por um aumento da taxa de alterações do DNA. Assim como em outros tipos de câncer, a neoplasia bucal maligna é multifatorial, acabando por determinar o desenvolvimento de um fenótipo alterado. Desse modo, seu diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento, o qual deveria iniciar antes do estabelecimento da neoplasia intra-epitelial e, certamente, antes da invasão tecidual (ORD; BLANCHAERT, 2000; MASSANO et al., 2006).

Numerosos fatores contribuem para o desenvolvimento do câncer bucal. O estudo desses fatores deveu-se a técnicas epidemiológicas, iniciadas pela pesquisa realizada por Wynder e colaboradores no ano de 1957 em um grupo de homens e mulheres americanos que foram a óbito em consequência de um câncer bucal (SHAFER; HINE; LEVY, 1987; ORD; BLANCHAERT, 2000).

Estudos epidemiológicos permitiram traçar um perfil do paciente de risco para o desenvolvimento do CECB. Fazem parte do grupo de risco homens brancos, acima dos 40 anos e que estão continuamente expostos aos fatores de risco associados ao tumor. Assim, a etiologia do câncer bucal é complexa e envolve

fatores como idade, gênero, raça, estilo de vida, herança genética, estado de saúde, condição socioeconômica e exposição a um ou mais agentes cancerígenos (MASSANO et al., 2006; CHATURVEDI et al., 2008).

Os principais fatores de risco e os melhor documentados na literatura são representados pelo uso do tabaco, do álcool, pela combinação de ambos e pela exposição à luz solar (especialmente para o carcinoma de lábio inferior) (WOODS et al., 1993; ORD; BLANCHAERT, 2000; OLIVEIRA; ODELL, 2000; MASSANO et al., 2006). O risco aumenta cerca de 4 até 6 vezes nos pacientes com consumo médio ou alto de tabaco, estando também relacionado com a precocidade da aquisição do hábito e de sua duração (MERLETTI et al., 1989). Também é observado que o risco para o desenvolvimento de CECB aumenta com a inclusão do hábito de fumar entre os não-fumantes, e que o risco chega a ser 35 vezes maior nos que consomem fumo (mais de 2 maços por dia) e álcool (mais de 4 doses por dia) (BLOT et al., 1988).

Quanto à idade, é importante observar que o tumor pode ocorrer em indivíduos jovens, apesar de pouco freqüente. Quanto ao gênero, ele é mais prevalente em homens, mas a disparidade na taxa homens/mulheres tem-se tornado menor, provavelmente porque as mulheres estão se igualando aos homens na exposição aos fatores de risco já citados. Quanto às condições socioeconômicas, é mais prevalente em pessoas de baixa renda e pouca escolaridade (SHAFER; HINE; LEVY, 1987; NEVILLE; DAY, 2002; MASSANO et al., 2006).

Contudo existem casos em que o CECB se desenvolve em indivíduos que não estão expostos aos elementos de risco associados mais importantes e conhecidos. Foram sugeridos como possíveis fatores etiológicos, a dieta, os fatores locais e as infecções fúngicas ou virais. Dentre os vírus, o papel do papilomavírus humano tem sido estudado por sua associação a neoplasias, por sua capacidade de imortalizar queratinócitos e pelo fato de que sua ação na mucosa bucal poderia ser similar à que ocorre no colo uterino, devido à semelhança entre os tecidos dessas áreas (SYRJÄNEN et al., 1983a; ARRAND; HARPER, 1998; MASSANO et al., 2006; GONZALEZ et al., 2007).

1.1.2 Papilomavírus humano

O papilomavírus é um vírus epiteliotrópico cuja partícula viral mede cerca de 55 nm, sem envelope, com capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros e genoma circular de DNA de fita dupla, com aproximadamente 7500-8000 pares de bases. Seu genoma pode ser dividido em três regiões principais: a controladora (LCR), a precoce (E=*early*) e a tardia (L=*late*). A região controladora está relacionada com a origem da replicação e com os elementos que regulam a expressão gênica dos HPVs. A região precoce codifica proteínas funcionais envolvidas no controle da transcrição, na replicação e no potencial carcinogênico do vírus. As proteínas E6 e E7 atuam na imortalização e transformação celular, sendo sempre expressas nos tumores malignos de cérvix uterina. A região tardia codifica as proteínas estruturais L1 e L2, componentes do capsídeo viral (Anexo 1) (PERRONE e PREMOLI-DE-PERCOCO, 1992; ARRAND; HARPER, 1998; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998; PHILLIPS; VOUSDEN, 1998; LI; STURGIS, 2006). Atualmente, são conhecidos mais de 200 tipos de HPV e provavelmente muitos ainda estão por serem descobertos (RITCHIE et al., 2003; MÜNGER et al., 2004).

A proteína E6 apresenta cerca de 150 aminoácidos. É capaz de induzir importantes modificações na célula hospedeira, apresentando efeito anti-apoptótico. Sua ação faz-se pela degradação das proteínas pró-apoptóticas Bak e p53. A proteína E6 associa-se a uma proteína celular, a E6-AP (*E6-associated protein*), e o complexo E6/E6-AP se liga à p53, inibindo sua atividade e levando à sua degradação pela via da ubiquitina. A proteína p53 é uma reguladora negativa do crescimento celular, porém, na presença de E6, a sua resposta ao dano do DNA fica impedida, não induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 ou a apoptose como normalmente aconteceria (ARRAND; HARPER, 1998; zur HAUSEN, 2000; HA; CALIFANO, 2004; HOFFMANN et al., 2004; NAIR; PILLAI, 2005; LI; STURGIS, 2006; HEBNER; LAIMINS, 2006; RAGIN; TAILOLO, 2007).

A proteína E7 apresenta 98 aminoácidos e também está associada a transformações na célula hospedeira, atuando principalmente pela ligação com a proteína ritinoblastoma (pRb). A pRb é uma proteína supressora tumoral que atua impedindo a progressão do ciclo celular no ponto de controle G1/S. Essa capacidade

estaria impedida na presença da proteína viral E7. A desestabilização da pRb por ação da E7 permite a liberação de E2F do complexo pRb/E2F. Isso permite que o E2F, um regulador da transcrição de genes associados à proliferação celular, transative os genes relacionados com a fase S do ciclo celular. Assim, E6 e E7 são capazes de immortalizar queratinócitos e induzir a síntese de DNA em células quiescentes. Todavia, somente a ação destas duas proteínas é insuficiente para o desenvolvimento de um fenótipo maligno (ARRAND; HARPER, 1998; SYRJÄNEN et al., 1999; zur HAUSEN, 2000; LAZZARI, 2002; HOFFMANN et al., 2004; QUEIROZ; 2006; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007).

De modo geral, o HPV induz a proliferação de células epiteliais da pele e da mucosa, que apresentam crescimento limitado e podem regredir espontaneamente. O tempo de incubação é bastante variável, ainda sendo pequeno o conhecimento sobre o tempo de latência ou persistência no organismo. A maioria dos tipos apresenta tropismo, por vezes exclusivo, pelo tecido que infecta. Há muito tempo os HPVs são conhecidos como causadores de tumores benignos (papilomas, verrugas comuns, condilomas), freqüentemente estando envolvidos nas transformações malignas, principalmente da cérvix uterina e, atualmente, da cabeça e pescoço (PSYRRI; DiMAIO, 2008).

A infecção viral inicia quando a partícula atinge e penetra nas células basais do epitélio, em células indiferenciadas e/ou em divisão. Uma vez ocorrida a internalização na célula hospedeira, a replicação acontece exclusivamente no núcleo celular. Os mecanismos da invasão viral na célula hospedeira, ainda que não totalmente elucidados, estão relacionados com as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ (CHANG et al., 1991; QUEIROZ, 2006).

A mucosa da cavidade bucal, por sua similaridade com a mucosa uterina cervical, também pode servir como um reservatório para as infecções por HPV. A rota de transmissão para a cavidade bucal e orofaringe não está bem estabelecida e ainda é motivo de discussão. A transmissão sexual pelo contato orogenital tem sido sugerida (SCULLY et al., 1988; PERRONE e PREMOLI-DE-PERCOCO, 1992; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998; SCULLY, 2005). O estudo de caso-controle de Ritchie et al. (2003), porém, não associou o contato orogenital com o risco de câncer bucal pela presença de HPV. Todavia, numa comparação caso-caso, a probabilidade do tumor ser positivo para HPV aumenta com a história de contato orogenital ou com um número elevado (>6) de parceiros sexuais durante a vida. As

formas de transmissão vertical pelo parto, a transmissão digital e a transmissão por fômites contaminados por HPV também foram sugeridas como possíveis, principalmente na presença de superfícies epiteliais maceradas ou abrasionadas (FRANCESCHI et al., 1996; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998).

As lesões bucais associadas com o HPV podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com seu comportamento biológico: lesões benignas e lesões pré-malignas ou malignas. As lesões bucais benignas incluem o papiloma de células escamosas, a verruga vulgar, o condiloma acuminado e a hiperplasia focal epitelial. Está bem documentada na literatura a clara associação dessas lesões com o HPV. Os principais tipos já identificados nas alterações benignas, pré-malignas ou malignas são os tipos 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 e 57. Sete deles (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35) foram isolados de mucosa normal (SYRJÄNEN et al., 1983a; SYRJÄNEN et al., 1983b; SYRJÄNEN et al., 1983c; SYRJÄNEN et al., 1987; GASSENMAIER; HORNSTEIN, 1988; GARLICK; TAICHMAN, 1991; MILLER; WHITE, 1996).

Dentre os tipos de HPV conhecidos, alguns são classificados como “HPV de alto risco” (HR-HPV, *high risk* HPV) ou oncogênicos, devido à sua freqüente associação com processos neoplásicos malignos, sendo os principais representantes os HPVs 16, 18, 31, 33 e 35. Os HR-HPVs foram detectados em mais de 90% das lesões de carcinoma epidermóide do colo uterino, estando bem estabelecida sua associação com a presença de tumores malignos nesse tecido (zur HAUSEN, 2000; LORINCZ et al., 1992; GIOVANELLI et al., 2002). Um estudo de acompanhamento realizado por Walboomers et al. (1999) envolvendo mais de 1000 pacientes mostrou que 99,7% dos cânceres de colo uterino apresentam DNA de HPV e provou que a pequena porcentagem de tumores negativos para HPV encontrada inicialmente por eles na realidade eram falso-negativos, pois, se o exame fosse repetido ou nova coleta de material fosse realizada, o resultado seria positivo para HPV. Apesar de os HR-HPVs terem sido identificados em lesões malignas da cavidade bucal, eles também foram encontrados na mucosa normal, mostrando que o seu papel no desenvolvimento de tumores da cavidade bucal ainda precisa ser melhor elucidado (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

A prevalência de carcinoma bucal relatada como associada ao HPV apresenta-se muito variável (0% até 100%), provavelmente devido às diferenças de sensibilidade dos diversos ensaios utilizados para sua detecção, desenho dos

estudos, cuidados na coleta das amostras, dentre outros fatores. Existem vários métodos para diagnosticar a infecção por HPV nos tecidos, como pelo aspecto característico da mucosa, por microscopia óptica e eletrônica, por IHC, por ISH e pela PCR. Nos estudos iniciais que procuraram verificar a técnica mais adequada, a PCR se mostrou a mais sensível para detecção do HPV na mucosa bucal (MAITLAND et al., 1989; CHANG et al., 1990 e 1991; SHROER; GREER, 1991; FRAZER et al., 1993; WOODS et al., 1993; HOLLADAY; GERALD, 1993).

Uma revisão da literatura realizada por Sugerman e Shillitoe (1997) sobre HR-HPV e câncer bucal concluiu que os HPVs do tipo 16 e 18 são os mais freqüentes, sendo que a infecção por estes vírus pode ser um co-fator na carcinogênese bucal, devido à sua capacidade de imortalizar queratinócitos. O vírus é particularmente encontrado nos carcinomas de língua e tonsilas palatinas (SCHWARTZ et al., 1998; GILLISON et al., 2000; KREIMER et al., 2004).

Segundo Cox, Scully e Maitland (1991), existe evidência de que ocorra uma deleção na região tardia do genoma do HPV 16. Isso não é comum, uma vez que os genes tardios do HPV 16 codificam proteínas estruturais envolvidas na montagem da nova partícula viral e no reconhecimento de receptores de superfície da célula hospedeira. É possível que essa deleção dos genes tardios nas cepas de epitélio bucal permita interações específicas entre as proteínas do capsídeo viral e os receptores do epitélio bucal (MEANWELL et al., 1987; HA; CALIFANO, 2004).

1.1.3 Papilomavírus Humano e Carcinoma Espinocelular Bucal

A possibilidade de existir uma relação entre o estabelecimento do CECB e a infecção por HPV foi relatada inicialmente por Syrjänen e colaboradores (1983a, b, c), e continua sendo alvo de inúmeros estudos. Muitas lesões bucais mostram que fatores combinados, incluindo a presença de HPV, aumentam o risco de transformação maligna celular (KASHIMA et al., 1990; PALEFSKY et al., 1995; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Os estudos de Syrjänen et al. (1983a; 1983b; 1983c; 1987) foram os primeiros a observar que a infecção por HPV poderia determinar alterações malignas nas células epiteliais da mucosa bucal. Syrjänen et al. (1983c) observaram que, das 40

amostras parafinadas de CECB analisadas por microscopia óptica para verificar possíveis características histológicas de infecção por HPV, 14 (35%) mostravam a presença de coilócitos. Utilizando a IHC, os autores sugeriram que a presença do HPV poderia ser o fator responsável por lesões como o papiloma de células escamosas, a hiperplasia focal e o condiloma acuminado, também podendo estar envolvido na etiologia do câncer bucal.

A partir destes estudos iniciais, surgiram, na literatura, inúmeras pesquisas que buscavam estabelecer a relação da infecção por HPV e as lesões bucais, benignas e malignas. Elas variavam principalmente nas técnicas usadas para a detecção do DNA viral. Testes de biologia molecular, como o *Southern Blot* (SB) (LÖNING et al., 1985) e ISH (MILDE; LÖNING, 1986; GASSENMAIER; HORNSTEIN, 1988; GREER; EVERSOLE; CROSBY, 1990; BUSTOS et al., 1999), foram utilizados. Todavia, Chang et al. (1990), utilizando as técnicas de ISH e PCR, concluíram que a PCR era o método mais rápido e sensível para detecção de um baixo número de cópias de seqüências do DNA do HPV. Ainda, enfatizaram que a PCR deveria ser incluída em programas de *screening* de HPV, permitindo acessar a real prevalência de infecções pelo vírus nas lesões bucais. Estudos subseqüentes também confirmaram esta observação (WATTS; BREWER; FRY, 1991; YEUDALL; CAMPO, 1991; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998; BADARACCO et al., 2000; UOBE et al., 2001; LAZZARI et al., 2004; DABIÉ et al., 2004; BOY et al., 2006), sugerindo que a PCR parecia ser uma técnica efetiva para a identificação do DNA do HPV em materiais biopsiados de lesões bucais (SHROYER; GREER, 1991).

Maden et al. (1992) estudaram 131 pacientes com diagnóstico confirmado para CECB e 136 com mucosa normal. Os autores verificaram, por meio da técnica da PCR, que o risco para câncer bucal em homens infectados pelo HPV 16 era 6.2 vezes maior do que nos homens não infectados.

Holladay e Gerald (1993) utilizaram, pela primeira vez em seu estudo, *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) universais que permitiram a detecção de vários tipos de HPV em lesões bucais pela técnica da PCR. O tipo 16 foi o mais prevalente nas lesões analisadas. Os autores concluíram que a presença do HPV nessas alterações não malignas poderia predispor o paciente à subseqüente carcinogênese como um veículo para a iniciação ou progressão do CECB, ou simplesmente por atuar como um co-carcinógeno na gênese dessa patologia. Dentre os tipos de HPV detectados nas lesões de CECB, os mais prevalentes são o HPV 16 e o HPV 18, sendo maior a

prevalência do primeiro (CHANG et al., 1990; MADEN et al., 1992; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998; PILLAI et al., 1999; SISK et al., 2000; BADARACCO et al., 2000; SOARES et al., 2007; GIOVANNELLI et al., 2002; HERRERO et al., 2003; NAIR; PILLAI, 2005).

Miller e White (1996) fizeram uma revisão de literatura de estudos epidemiológicos (n=58) sobre o papel do HPV em lesões bucais. Apesar das limitações do estudo (relatadas no artigo), os autores puderam concluir que o envolvimento do HPV no processo neoplásico bucal estava bem evidenciado na literatura. A prevalência do vírus aumentava com a progressão da displasia. A detecção do HPV nas lesões de CECB foi duas vezes maior que na mucosa normal. A presença do DNA de HPV foi 11 vezes mais freqüente no tecido tumoral do que na mucosa bucal distante da lesão. O fenótipo viral identificado no tumor primário manteve-se em 76% das metástases linfáticas.

Cruz et al. (1996) detectaram a presença do HPV em 54,3% (n=26) das amostras de CECB. A maioria dos casos positivos (78,9%) apresentou o HPV 16. Os autores não detectaram o vírus nas amostras de mucosa normal do grupo controle. Além disso, foi possível estabelecer uma associação altamente significativa entre a idade e a presença de HPV, os pacientes com mais de 60 anos apresentando uma baixa prevalência do vírus (29,4%) quando comparados com os pacientes abaixo dessa idade (77,8%; $p < 0,05$).

Schwartz et al. (1998), em um estudo de caso-controle, observaram algumas variáveis importantes associadas com CECB. O estudo confirmou as associações já conhecidas com o fumo, o álcool ou a combinação de ambos, a última aumentando em 11 vezes o risco para o desenvolvimento da lesão. Para ambos os gêneros, as associações com a história sexual foram extremamente fortes nos tumores onde o HPV foi detectado. Também, foi observado que a razão de proporção (*odds ratio*) para o HPV 16 dos indivíduos no grupo de casos que haviam praticado sexo oral com 5 ou mais parceiros foi de 2,1. Na população em estudo, o HPV 16 foi detectado em 16,5% (41 de 248) dos CECB. Os resultados não apresentaram fortes evidências de que a rota de transmissão sexual sustente as infecções bucais por HPV com o risco para o câncer bucal. A condição socioeconômica dos analisados também foi observada, verificando-se que a baixa renda familiar estava diretamente associada a um aumento do risco para CECB.

Smith et al. (1998) realizaram um estudo para determinar a frequência e os tipos de HPV em pacientes com CECB e saudáveis. Variáveis como idade, gênero, uso de tabaco ou/e álcool, atividade sexual, raça, estado civil e educação foram analisadas. Um resultado extremamente significativo foi que o HPV estava associado ao aumento do risco para o câncer bucal independentemente da exposição ao tabaco ou álcool.

No estudo de Pillai et al. (1999), os HPV16 e 18 estavam presentes em 39 das 61 amostras de CECB. Os autores ainda observaram que a proteína viral E6 encontrava-se em 22 das 36 lesões HPV-positivas. Também, havia uma correlação significativa entre a extensão da anormalidade histológica e a infecção pelo vírus.

Al-Bakkal et al. (1999) utilizaram o método da transcriptase reversa associada à PCR *in situ* para detectar e determinar a expressão do mRNA (RNA mensageiro) de E6. Foram estudadas 79 lesões benignas, cancerizáveis e malignas em uma população de indivíduos com e sem imunodepressão. Os autores puderam observar que, nas lesões cancerizáveis e nas malignas, a expressão do mRNA de E6 era 16 vezes maior que nas lesões benignas. Perceberam, ainda, que os indivíduos imunodeprimidos expressavam 10 vezes mais o mRNA de E6 do que os não deprimidos. Tais dados permitiram aos autores concluir que a integração do vírus no genoma de um hospedeiro imunodeprimido poderia desempenhar um papel no desenvolvimento do CECB.

Sisk et al. (2000) buscaram verificar se havia diferença na prevalência de lesões de CEC da cabeça e pescoço infectadas por HPV em grupos de pacientes adultos jovens (idade média 39 anos) e de pacientes idosos (idade média 66 anos). O estudo não encontrou uma diferença estatística significativa, sugerindo que o vírus desempenharia um papel similar em ambos os grupos. Das amostras contendo HPV (15 de 32), 60% apresentavam o tipo 16 (9 de 15). A técnica utilizada foi a PCR. Um dado interessante foi que os autores encontraram uma taxa de sobrevivência maior no grupo que apresentava as lesões contaminadas pelo vírus.

Badaracco et al. (2000) estudaram a prevalência do HPV em 66 pacientes com tumor, sendo que 38 se localizavam na cavidade bucal. O DNA do HPV foi detectado pela técnica da PCR, reconhecendo os genes *early* e *late*. Vinte e quatro casos (36,4%) estavam infectados pelo vírus. O HPV 16 estava presente em 7 das 12 lesões positivas. Os autores não encontraram associação significativa entre a

presença do vírus e as demais variáveis estudadas (idade, gênero, estágio do tumor, grau de diferenciação e uso de álcool e/ou tabaco).

Gillison et al. (2000) fizeram um estudo retrospectivo sobre o papel do HPV na etiologia dos tumores malignos da cabeça e pescoço. O HPV foi detectado em 25% da amostra (62 em 253). O tipo 16 foi encontrado em 90% dos tumores HPV-positivos. Um dado interessante é que, de forma similar aos achados de Sisk et al. (2000), os autores observaram que os pacientes que apresentavam suas lesões infectadas pelo vírus tiveram uma redução do risco de morte pelo tumor de 59%.

Um estudo brasileiro realizado por Vidal et al. (2001; 2004), em 40 amostras de carcinoma bucal coletadas por citologia esfoliativa, utilizando a captura híbrida (Digene), obtiveram com resultados a presença de HPV de baixo e alto risco em 22,5% (n=9) das amostras.

Premoli-de-Percoco e Ramirez (2001) realizaram um estudo com 50 mulheres venezuelanas pesquisando HPV e o tipo presente nas biópsias de lesões de CECB e quais os fatores associados que poderiam favorecer a persistência do vírus. O vírus foi detectado em 30 (60%) lesões, localizadas principalmente na língua (30%), na mucosa bucal (16,7%) e no assoalho da boca (16,7%). A idade de maior incidência do vírus no CECB foi em mulheres entre 50 até 69 anos. O estudo permitiu observar que o HPV 16 estava mais associado a lesões em estágio clínico inicial, enquanto o HPV 18 foi verificado em estágio clínico mais avançado. As pacientes HPV-positivas também eram fumantes (86,6% - 26/30), bebiam socialmente (63,3% - 19/30) e apresentavam oito ou mais parceiros sexuais (66,6% - 20/30). Ainda, os autores verificaram que o aumento da incidência do tumor estava associado com o baixo nível educacional, a idade precoce da primeira relação, entre outros fatores.

O estudo de Mork et al. (2001) confirmou a hipótese de que o HPV 16 poderia ser um fator de risco para o CEC da cabeça e pescoço, pacientes soro-positivos para o vírus apresentando um risco maior (2,2) que o observado em outros tipos de HPV. Ainda, não houve diferença significativa de risco entre homens e mulheres. Contudo, o estudo não foi capaz de demonstrar a relação causa-efeito entre a infecção por HPV 16 e o CEC da cabeça e pescoço.

Um estudo, abrangendo o período de 1982 até 1997, foi realizado por Miller e Johnstone (2001). Os autores buscaram estimar o risco de detecção do HPV na mucosa bucal normal, em lesão cancerizável e no carcinoma bucal usando a meta-

análise. Relatos de casos, séries clínicas e artigos de revisão publicados em revistas de língua inglesa foram pesquisados no *MedLine*, de janeiro de 1980 até agosto de 1998. Dados de 94 artigos que analisaram cerca de 4680 amostras foram incluídos no estudo. Feitos os devidos ajustes, os autores puderam concluir que o HPV foi detectado de 2 a 3 vezes mais na mucosa de lesões pré-malignas e 4,7 vezes no carcinoma bucal que na mucosa normal. Tais achados apresentaram evidência quantitativa de que a infecção bucal pelo HPV, particularmente pelos tipos oncogênicos, seria um fator de risco independente significativa para o CECB.

Sugiyama et al. (2003) buscaram esclarecer a associação do HPV (os tipos 16 e 18) com a carcinogênese bucal, especialmente nos estágios iniciais. Para isso, os autores analisaram amostras obtidas do epitélio bucal normal (n=44), com displasia (n=51) e com CEC (n=86), utilizando a técnica da PCR. O HPV 16 foi detectado em 36% (16) das amostras de mucosa normal. Nas amostras de tecido com displasia, 61% (31) foram positivas para o DNA do HPV 16. É importante observar que o DNA do HPV 16 foi detectado em 18 das 22 displasias (82%) que evoluíram para CEC, mas foi encontrado em apenas 13 das 29 displasias (45%) que não progrediram para carcinoma. O HPV 18 não foi observado em nenhuma das amostras de tecido normal ou displásico. O HPV 16 foi detectado em 35% das lesões de CEC e o HPV 18, em apenas duas lesões. O estudo verificou que os pacientes com displasia apresentavam 40 anos ou mais. A mesma idade foi observada para o CEC, mas o tumor aumentava sua taxa a cada década de vida. Os resultados permitiram sugerir que o HPV 16 poderia estar correlacionado com os estágios iniciais da carcinogênese bucal. Ainda, possibilitou aos autores especularem sobre a possibilidade de o vírus poder agir como um iniciador da proliferação, não sendo um requisito para a manutenção e para a progressão do estado de malignidade.

Herrero et al. (2003) conduziram um dos únicos estudos multicêntricos de caso-controle onde foram recrutados 1670 pacientes para o grupo caso, sendo que 1415 apresentavam câncer na cavidade bucal, e 1732 pacientes para o grupo controle. Todos os participantes foram entrevistados, realizaram citologia esfoliativa bucal e foram colhidas amostras de sangue. Foi realizada biópsia dos pacientes com tumor. O DNA do HPV foi detectado pela técnica da PCR. Os resultados revelaram que o tipo de HPV mais freqüente foi o 16, que o vírus desempenhava um papel na

carcinogênese bucal e que o DNA viral foi detectado com maior freqüência nos indivíduos que tinham mais de um parceiro sexual ou praticavam sexo oral.

Um estudo de Smith et al. (2004a) buscou determinar se existiam diferenças significativas entre fatores de risco e características do tumor entre casos de câncer HPV-positivo e negativo. A prevalência de HPV de alto risco foi de 20% nos casos de câncer. Três tipos de HPV foram identificados: 16 (87%), 18 (3%) e 33 (11%). Os fatores de risco para o HPV de alto risco foram: idade jovem (≤ 55 anos), os mais jovens com mais parceiros sexuais e a prática de sexo orogenital ou oroanal. Quanto às características do tumor, as amostras de câncer com HR-HPV apresentaram uma citologia esfoliativa positiva para HR-HPV, estágios mais avançados e envolvimento de nódulos linfáticos. De acordo com estudos já citados nesta revisão, o estudo de Smith et al. (2004a) pode concluir que a prevalência do HPV oncogênico é maior em pacientes mais jovens e que está tipicamente associada à transmissão sexual do vírus. Além disso, o estudo levantou a possibilidade da utilização da citologia esfoliativa com um importante meio de diagnóstico para os tipos de HPV presentes em cânceres cervicais e de boca.

Zhang et al. (2004), buscando conhecer a prevalência de HPV 16 e 18 em lesões de CECB e na mucosa normal e correlacionar os dados de virologia com as demais variáveis estudadas (tabaco, álcool, localização e tamanho do tumor, grau histológico), não encontraram associação significativa entre a presença de HPV e outros fatores de risco, mas observaram uma associação significativa ($p=0,040$) com a presença de HPV 16 e 18 nas lesões de CECB, sendo os mesmos cofatores da carcinogênese bucal, particularmente em homens com menos de 60 anos. Também demonstraram que a infecção por HPV é comum na mucosa bucal normal.

Tinoco et al. (2004) realizaram um estudo retrospectivo, a partir de blocos parafinados, de lesões bucais malignas (CECB – 38 casos) e benignas (hiperplasia epitelial papilomatosa e papiloma – 20 casos). Os autores não encontraram associação estatisticamente significativa entre a presença de HPV e os casos de CECB, mas está foi positiva para as demais lesões.

Correnti; Rivera; Cavazza (2004) buscaram verificar a prevalência de HPV em 16 lesões de CECB de amostras parafinadas. Os autores verificaram que 50,0% das amostras estavam infectadas por HR-HPV. Ainda que em 68,0% das amostras HPV-positivas, o tumor foi classificado histologicamente como moderadamente diferenciado e o local anatômico mais prevalente foi o rebordo alveolar.

Uma revisão sistemática de Kreimer et al. (2005), utilizando 60 estudos que em sua metodologia usaram a técnica da PCR para detecção do DNA viral em CEC da cabeça e pescoço, observaram que a presença de HPV era muito mais prevalente nos tumores da orofaringe (35,6%; n=969) do que nos da cavidade bucal (23,5%; n=2642). O tipo mais presente foi o HPV 16 (86,7%).

Ibieta et al. (2005), em um estudo na população mexicana com 51 casos de CECB retirado de biopsias frescas congeladas e usando a técnica da PCR para detecção do DNA viral, observaram o HPV presente em 42% dos pacientes, sendo o tipo 16 (66,6%) o mais prevalente. O estudo não encontrou diferenças entre a presença ou ausência de HPV em relação aos hábitos de fumo e álcool.

Hansson et al. (2005), em um estudo de caso-controle de CEC da boca e orofaringe, observaram uma forte associação entre a infecção por HR-HPV e o tumor; 36% (47; n=132 casos) dos tumores foram positivos para HPV, principalmente o tipo 16 (81%), sendo que preferencialmente no localizados na orofaringe e base da língua.

Uma meta-análise e revisão sistemática, realizada por Hobbs et al. (2006), buscou esclarecer o papel do HPV na carcinogênese da cabeça e pescoço. Esses pesquisadores reuniram 17 estudos, em que buscaram comparar a presença de HPV em sítios específicos nos tumores da cabeça e pescoço (1656 casos de cavidade bucal, 383 de orofaringe, 161 de tonsilas e 412 de laringe). Os resultados permitiram concluir que o HPV era fator de risco para esses tumores, e que o principal sítio de infecção eram as tonsilas.

Fakhry e Gillison (2006), em seu artigo de revisão sobre a relação do HPV com os tumores da cabeça e pescoço, observaram as implicações clínicas da infecção viral. Os autores pontuaram que a infecção pelo HPV pode estar alterando variáveis demográficas dos pacientes com tumores da cabeça e pescoço. Eles tendem a ser mais jovens, não-tabagistas e não-etilistas. Os pacientes com lesões HPV-positivas apresentam, no mínimo, metade do risco de morte pelo tumor, quando comparados aos HPV-negativos.

Soares et al. (2007) estudaram 75 peças parafinadas de CECB pela técnica da PCR, usando os *primers* para HPV GP5+ e GP6+. Os tipos virais encontrados nos 18 casos positivos foram o HPV 16 e o 18; O HPV 18 em 77,8% dos casos (14), o HPV 16 em apenas 1 caso e a dupla infecção pode ser observada em 16,7% dos casos (3). Pela baixa incidência do HPV, o estudo sugere a possibilidade da

participação do vírus no desenvolvimento e na progressão de um pequeno subgrupo destes tumores.

No estudo de Silva et al. (2007), os autores verificaram uma alta infecção por HPV no CECB de língua. Das 50 amostras estudadas, 37 (74%) foi positiva para HR-HPV. Nenhuma amostra do grupo controle foi positiva para HPV.

O estudo de D'Souza et al. (2007) foi dos poucos encontrados na literatura utilizando os testes moleculares da Roche – Amplicor e Linear Array, para detecção de HPV em lesões de CEC da orofaringe. Os autores concluíram que a infecção por HPV estava altamente associada com o CEC da orofaringe, na presença ou ausência dos fatores de riscos já bem estabelecidos – tabaco e álcool. Dos pacientes com tumor da orofaringe, 85% bebiam e 56% fumavam (n=100). Os resultados permitiram aos autores observarem que o tabaco e o álcool não foram co-fatores associados à carcinogênese mediada por HPV.

No estudo de Gallegos-Hernández et al. (2007), foi observado que o HPV 16 era o mais prevalente nas lesões estudadas (70%; 50; n=118), sendo encontrado principalmente nos casos de orofaringe e laringe. Os resultados permitiram concluir que o HPV atuaria como um co-fator na carcinogênese da cabeça e pescoço.

Pintos et al. (2008) realizaram um estudo de caso-controle em Montreal, Canadá, em que buscaram conhecer a associação entre o HPV 16, 18 e 31 e o risco de desenvolvimento de câncer bucal e da orofaringe. O HPV foi detectado em 19% dos casos (14; n=72) e em 5% dos controles (6; n=129). A evidência de uma relação etiológica ficou clara para os tumores tonsilares, mas não para os demais.

Gillison et al. (2008) fizeram um estudo de caso-controle, com base hospitalar, de CEC da cabeça e pescoço, buscando conhecer um perfil de risco na presença e na ausência de infecção por HPV 16. As amostras foram obtidas de blocos parafinados, coleta de bochecho bucal e biopsias congeladas. Os autores não encontraram evidências de interação multiplicativa entre o consumo de tabaco, álcool, HPV 16-positivo e HPV 16-negativo. Ainda, a razão de chance (*odds ratio*) para o HPV 16-negativo aumenta quanto maior a exposição ao tabaco e ao álcool.

Um trabalho recente realizado no Brasil (SIMONATO et al., 2008), em CECB de assoalho bucal (n=29) de amostras obtidas de blocos parafinados, usando a PCR para detecção do DNA viral, encontrou baixa incidência de HPV (17,2%; n=5), descartando a possibilidade do vírus por si só ter um papel significativo na carcinogênese do CECB. Os autores também não encontraram associação

significativa entre variáveis como gênero, raça, idade, estadiamento clínico do tumor, consumo de tabaco e álcool e a presença do HPV.

Outro estudo brasileiro (ACAY et al., 2008) observou em seus resultados que o HPV não desempenha um papel na progressão da transformação maligna das lesões bucais. Todavia, não o descartam como fator de risco na carcinogênese bucal.

Scapoli et al. (2008) encontraram uma baixa prevalência de infecção por HR-HPV no seu estudo (2%; n=314). O material para a PCR (*real-time* PCR) foi obtido de amostras parafinadas e frescas. Os resultados foram analisados por ISH.

Todavia o estudo de Chaturvedi et al. (2008), de CECB e HPV nos Estados Unidos da América, observou que, de 1973 até 2004, a proporção de CECB relacionada com a infecção por HPV aumentou, particularmente entre homens mais jovens. O estudo também observou que a taxa de sobrevivência era mais elevada em pacientes HPV-positivos.

Anaya-Saavedra et al. (2008), em um estudo de caso-controle no México para CECB, encontraram uma forte associação entre o tumor e a presença de HPV de alto risco (16 e 18), o confirmando como fator de risco associado ao tumor.

Como pode ser observado nesta revisão de literatura, ainda existem muitas dúvidas sobre o papel do HPV na carcinogênese bucal, especialmente no CECB. Acredita-se que os resultados, muitas vezes inconsistentes, relacionando o HPV com este tumor possam ser devidos às variações genéticas na etiologia do tumor e no envolvimento dos vários tipos de HPV. Ainda, os diferentes estudos acabam por determinar variações nos números da população, nas combinações topográficas e nos métodos utilizados para detecção do DNA viral (WALLIN et al., 2000; RITCHIE et al., 2003; HERRERO, 2003). O sítio do tumor tem se mostrado um fator relevante. Os estudos de CEC da cabeça e pescoço têm conseguido estabelecer a associação positiva com o HPV de alto risco, principalmente nos que envolvem a orofaringe, sugerindo um fator etiológico distinto para os demais (HERRERO et al., 2003; RAGIN; TAIOLI, 2007).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de HPV nas lesões de CECB em pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS e do Hospital Independência da ULBRA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a presença de HPV nas lesões de CECB por meio de amplificação do genoma viral;
- b) determinar o tipo de HPV presente por meio de hibridização reversa;
- c) verificar a associação das variáveis sociodemográficas comportamentais tabaco e álcool com da infecção positiva e negativa por HPV;
- d) descrever variáveis sociodemográficas da amostra estudada.

1.3 HIPÓTESE

A infecção por papilomavírus humano está associada às lesões de carcinoma espinocelular bucal.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

Periodic – Oral Diseases

Title – Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma in a south Brazilian population

Short Title – HPV and OSCC in a south Brazilian population

Full name of authors: Myrian Christina Corrêa da Camara Hewson Brew , Rita Trapp, Juliana Balbinot Hilgert, Virgínia Minghelli Schmitt

Name of the institution(s) where the work was performed – Instituto de Pesquisas Biomédicas and Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

Address and name of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent to:

Myrian Christina Corrêa da Camara Hewson Brew

Rua Nossa Senhora Aparecida, 221 - Porto Alegre, RS, Brazil – CEP 91920-690

Telephone number: xx555132647320; Fax number: xx555132647320

e-mail address: mcbrew@terra.com.br

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é um grave problema de saúde pública e acredita-se que sua taxa de mortalidade aumentará em 50% nos próximos 20 anos. O câncer bucal é o 6º tumor mais incidente no mundo, com mais de 300.000 casos novos por ano, é mais freqüente em homens do que em mulheres, sua incidência variando entre 1 a 10 casos a cada 100.000 habitantes pelo mundo (WHO, 2008). Dentre suas manifestações, o carcinoma espinocelular bucal (CECB) compreende cerca de 90-95% dos tumores diagnosticados na boca e na orofaringe. O uso de tabaco e o consumo excessivo de álcool têm sido considerados responsáveis por cerca de 90% dos tumores da cavidade bucal, o risco de desenvolvimento do tumor aumentando frente à combinação de ambos. Todavia, tem sido observado na literatura que existem casos da presença de CECB na ausência de fumo e álcool. Dentre inúmeros fatores que poderiam tomar parte no processo da carcinogênese bucal, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) tem sido sugerida.

O HPV é um dos vírus mais presentes em diversas lesões benignas e malignas humanas. Cerca de 200 tipos já foram identificados. Estes foram divididos de acordo com seu envolvimento no processo de carcinogênese em HPV de baixo risco e HPV de alto risco, os últimos considerados oncogênicos. Dentre os HPVs de alto risco, o HPV 16 e o HPV 18 têm se mostrado mais prevalentes nos estudos dos tumores da cabeça e pescoço, com predomínio do primeiro. O potencial oncogênico do HPV envolve, principalmente, as proteínas E6 e E7, que são capazes de inibir a atividade de reguladores negativos do ciclo celular, como p53 e pRb respectivamente, levando a um descontrole na apoptose, na regulação do ciclo celular e na imortalização de células.

Sua associação com o câncer da cérvix uterina já está bem estabelecida na literatura, iniciando pelos estudos de zur Hausen e colaboradores. O grupo de Syrjänen, em 1983, sugeriu pela primeira vez a possibilidade do envolvimento do HPV com os tumores bucais. Estabelecer a associação do vírus com o CECB tem sido difícil, provavelmente devido à sua heterogeneidade e ao fato de que apenas

uma parcela destes tumores pode estar infectada pelo vírus. O estabelecimento nas pesquisas da localização do tumor no que diz respeito a ter sua origem na cavidade bucal ou na orofaringe é importante (HERRERO et al., 2003).

Assim, desde os trabalhos iniciais em 1983, inúmeras pesquisas na área da Odontologia têm buscado esclarecer o papel do HPV na carcinogênese dos tumores da cabeça e pescoço. A variabilidade dos achados é bastante ampla e significativa, e estudos mostram uma associação de 0% até 100% do vírus com estes tumores, principalmente com o CECB (MILLER e JOHNSTONE, 2001; HA e CALIFANO, 2004).

A discussão presente na literatura tem procurado responder à razão desta variabilidade e muitas são as hipóteses sugeridas. Fatores relacionados com a sensibilidade e especificidade dos testes moleculares utilizados para detecção do DNA viral, o tipo de amostra utilizada para extração do DNA, o tipo de tumor e sua localização, o tamanho da amostra nos estudos realizados, a abordagem epidemiológica empregada, as variabilidades sociodemográficas, socioculturais e regionais das populações em estudo são citados na literatura (MILLER e WHITE, 1996; ZHANG et al., 2004; IBIETA et al., 2005; TERMINE et al., 2008; PSYRRI e DiMAIO, 2008).

Quanto à ampla variabilidade das amostras utilizadas para a detecção do DNA viral (*swabs*, citologia esfoliativa, coleta por bochecho e biópsias), Smith et al. (2004a) sugeriram o uso de células esfoliadas em tumores da cabeça e pescoço. Sugiyama et al. (2007) consideram a material biopsiado uma amostra mais representativa da mucosa bucal quando comparada à citologia esfoliativa, pois a primeira inclui também células da camada basal onde o vírus pode estar em sua forma latente ou produtiva.

Apesar de o estudo de Kansky et al. (2006) não ter observado variações significativas entre diferentes testes moleculares – IHC, ISH e PCR - na detecção do DNA do HPV nas lesões de CEC infectadas pelo vírus, a grande maioria dos estudos cita a PCR como o teste mais sensível, pois é capaz de detectar menos que uma cópia de DNA viral por célula (TERMINE et al., 2008). Outro ponto importante a ser considerado é a variedade nos *primers* utilizados, isto é, se são tipo-específicos ou *primers* universais (MILLER e WHITE, 1996; KREIMER et al., 2005).

Atualmente testes moleculares padronizados têm sido desenvolvidos pela indústria com o intuito de promover uma maior sensibilidade e especificidade dos

métodos empregados, visando a um diagnóstico mais acurado e possibilitando o desenvolvimento de vacinas para os HPVs mais prevalentes na população.

O presente estudo consiste em uma série de casos de CECB que buscou superar algumas das diferenças dos achados da literatura por meio de uma construção metodológica que levou em consideração limitações existentes e citadas nos estudos revisados, principalmente no que concerne à amostra e ao método de diagnóstico molecular utilizado. Assim, foram tomadas as seguintes precauções: i) as amostras de CECB eram de tecido biopsiado fresco e congelado, para evitar maiores danos ao DNA; ii) as amostras eram livres de tecido normal, para garantir que o DNA do HPV estava comprometido com o tumor; e, iii) um teste comercial de alta sensibilidade e confiabilidade foi utilizado para detecção e genotipagem na análise do HPV.

A população deste estudo (n=17) caracterizou-se por ser composta em sua maioria por homens (76,5%), com idade igual ou superior a 65 anos (52,9%), 76,5% casados dos quais 47,1% exerciam atividade laboral. Quanto ao tabaco e ao álcool, 29,4% não fumavam e 29,4% não bebiam. Sobre os tumores, 35,3% (6/17) estavam localizados nos dois terços anteriores da língua, apresentavam um tamanho maior que 2 cm (52,9%), haviam sido detectados nos pacientes nódulos à palpação no exame físico (52,9%) e 64,7% dos tumores foram classificados histologicamente como moderadamente diferenciados (Grau II) (Tabela 1).

O presente estudo encontrou uma prevalência relativamente alta de HPV (47,1%) na população, sendo que todas as amostras HPV-positivas estavam infectadas pelo HPV 16 de alto risco. Duas amostras apresentavam infecção dupla, uma por HPV 16/18 e outra por HPV 16/33 (Tabela 2). Quanto aos pacientes HPV-positivos, foi observado que 75,0% eram homens caucasianos, com mais de 57.88 anos (± 14.44), que não estavam expostos ao fumo e álcool (37,5%), mas apenas dois pacientes (25,0%) não foram expostos aos dois fatores por toda vida. Quanto às características do tumor, 75,0% foram classificados histologicamente como moderadamente diferenciados (Grau II), 62,5% apresentavam um tamanho menor que 2 cm e 75,0% não apresentavam nódulos palpáveis no exame físico realizado durante o procedimento da biópsia (Tabela 3).

Como já foi comentado, é ampla a variabilidade quanto à prevalência de HPV nas lesões de CECB nos estudos da literatura, conforme pode ser observado no

Quadro 1, que apresenta uma revisão de estudos atuais (2004/2008) envolvendo pesquisa de HPV nos tumores da cabeça e pescoço.

Uma das diferenças do presente estudo para aqueles da literatura que tiveram uma baixa prevalência de HPV nas lesões estudadas pode ser devida ao fato de a maioria destes estudos utilizar material parafinado para a extração e amplificação do DNA viral. A fixação em formol a 10% da peça cirúrgica, a posterior inclusão em parafina e a desparafinização para o estudo molecular podem determinar uma substancial degradação do DNA presente na amostra, dificultando ou tornando impossível a sua detecção (KANSKY et al., 2003; SILVA et al., 2007).

O tipo de HPV de alto risco mais freqüentemente encontrado nos estudos é o HPV 16, seguido do HPV 18. O presente estudo teve uma prevalência de 100% para HPV 16 nos casos de HPV-positivos. Os seus resultados são parcialmente consistentes com a literatura atual, porém diferem de alguns outros estudos. Esta diferença talvez possa ser explicada por fatores sociodemográficos e culturais, como também por particularidades referentes à amostra selecionada e à metodologia empregada.

Tem sido observado na literatura um aumento na incidência do CECB em indivíduos mais jovens (com menos de 45 anos) e em mulheres, alterando o perfil epidemiológico desta lesão (Smith et al., 2004a; Gillison et al., 2008). Todavia, estes dados variam de acordo com a região geográfica estudada. A incidência mais alta no gênero masculino foi observada em Somme, França, e a mais alta no feminino foi constatada em Bangalore, Índia (PARKIN et al., 2002). A idade média para diagnóstico do tumor é ainda em indivíduos mais velhos (63 anos) (RIES et al., 2005). Os dados encontrados neste estudo são consistentes com as estimativas do INCA para o Brasil, onde a maior incidência do câncer bucal é ainda no gênero masculino com idade superior a 60 anos (BRASIL, 2008).

No que concerne à exposição ao tabaco e ao consumo de álcool, estes dois fatores ainda são os mais relacionados com o CECB. Todavia, têm surgido na literatura estudos que mostram a presença do tumor na ausência de ambos os fatores de risco mais amplamente estudados, e a infecção por HPV tem sido sugerida como fator etiológico associado (GILLISON et al., 2000; HERRERO et al., 2003; APPLEBAUM et al., 2007). O presente estudo não pode estabelecer uma associação significativa entre o tabaco e o álcool e a infecção por HPV. O estudo de Dahlstrom et al. (2003), em 60 pacientes não-fumantes com CEC da cabeça e

pescoço, não encontrou uma associação positiva entre a presença do vírus e o CEC, mas a técnica molecular utilizada pelos autores foi de baixa sensibilidade e especificidade. Resultado similar também foi verificado do estudo de Siebers et al. (2008), na ausência de tabaco e álcool. Todavia, Simonato et al. (2008) observaram uma maior prevalência de HPV entre os não-fumantes.

Ano	Estudo	No de casos	País	Amostra	Método	HPV+	Tipo
2004	Correnti et al.	16*	Venezuela	Parafina	PCR	8	HR
2004	Vidal et al.	40	Brasil	Esfoliação	DIGENE	11	HR
2004	Lazzari et al.	80/2*	Brasil	Biópsias	PCR	9/0*	ni
2004	Smith et al.b	201	EUA	Esfoliação	PCR	57	16,33
2004	Zhang et al.	73*	Japão	Parafina	PCR	54	16,18
2004	Tinoco et al.	38*	Brasil	Parafina	IHC	16	ni
2005	Koppikar et al.	102/83*	Índia	Biópsias	PCR	18*	16,18
2005	Xavier et al.	20	Brasil	Parafina	Histológico	15	ni
2005	Tachezy et al.	68	Republica Tcheca	Parafina/biópsias	PCR	35	16
2005	Hansson et al.	131*	Suécia	Esfregaço	PCR	52	HR
2005	Ibeta et al.	50	México	Biópsias	nPCR	21	16
2006	Rivero e Nunes	23*	Brasil	Parafina	PCR	0	ni
2006	Campisi et al.	63*	Itália	Esfoliação	PCR	24	18
2006	Petrini et al.	25*	Itália	Parafina	PCR	5	16
2006	Boy et al.	59	África do Sul	Parafina	RT-PCR; ISH	7	18
2007	Silva et al.	60*	Brasil	Biópsias	PCR	37	ni
2007	D'Souza et al.#	100	EUA	Parafina/biópsias	PCR	72	16
2007	Soares et al.	75*	Brasil	Parafina	PCR	18	16,18
2007	Furniss et al.	314*	EUA	Parafina	PCR	74	16
2007	Gallegos-Hernández et al.	118	México	Biópsias	PCR	50	16
2008	Siebers et al.	7	Noruega	Parafina	ISH/PCR	0	0
2008	Sugiyama et al.	23	Japão	Parafina	PCR	24	16
2008	Pintos et al.	72	Canadá	Esfoliação	PCR	14	16
2008	Gillisson et al.#	240	EUA	Parafina /biópsias	PCR; ISH	92	16
2008	Liang et al.	51*	EUA	Biópsias	PCR	1	16
2008	Simonato et al.	29*	Brasil	Parafina	nPCR	5	ni
2008	Scapoli et al.	280*	Itália	Parafina /biópsias	RT-PCR; ISH	5	16
2008	Anaya-Saavedra et al.	62*	México	Biópsias	PCR	27	16,18

* = casos específicos de CECB; # = usou o Roche Molecular Systems

ni = não identificado; PCR= reação em cadeia da polimerase; nPCR= nested-PCR; RT-PCR= real time-PCR; ISH= hidridização *in situ*; HR= alto risco; IHC= imunohistoquímica

Quadro 1 Prevalência de HPV em carcinoma espinocelular bucal em estudos da literatura.
Fonte: a Autora (2009)

Quanto à localização do tumor, tem sido observado na literatura que a distinção entre a cavidade bucal e a orofaringe é importante nos CEC da cabeça e pescoço (HERRERO et al., 2003; KREIMER et al., 2005). Essa falta de cuidado

poderia determinar um resultado equivocado nos estudos realizados, em que uma alta prevalência de HPV poderia estar sendo atribuída ao CECB quando na realidade seriam de tumores da orofaringe. Esse fato adquire grande significado com alguns estudos que demonstraram uma predileção da infecção por HPV nos tumores da orofaringe (MILLER e WHITE, 1996; KREIMER et al., 2005; BOY et al., 2006).

No presente estudo, todas as amostras eram de CEC da cavidade bucal, a maioria na língua, assoalho da boca e rebordo alveolar, a presença de HPV sendo maior no assoalho da boca. Alguns estudos da literatura observaram o mesmo resultado (PREMOLI-DE-PERCOCO e RAMIREZ, 2001; SUGIYAMA et al., 2003). Apesar de a língua ser o sítio mais comum do CECB, quando a infecção por HPV é analisada, a prevalência é baixa. Kantola et al. (2000) observaram que nenhuma das 105 lesões de CECB HPV-positivas estavam localizadas na língua. Liang et al. (2008) detectaram o DNA viral em apenas 1 das 51 lesões de CEC da língua estudadas. Todavia, para D'Costa et al. (1998) e Schwartz et al. (2001), a língua foi o sítio mais freqüente.

Quanto ao grau histológico do tumor, a maioria dos estudos não encontrou uma associação significativa entre esta variável e a presença de infecção por HPV (CHANG; LIN; CHIANG, 2003; ZHANG et al. 2004), com exceção do estudo de Schwartz et al. (2001) que observou que a prevalência de HPV-positivo era maior em lesões de CECB classificadas como graus II e III. Apesar de os achados do presente estudo não encontrarem uma associação entre essas variáveis, provavelmente devido ao tamanho da amostra, 75% dos tumores HPV-positivos foram classificados como grau II. Não está claro na literatura se existe uma associação do grau histológico do CECB e a infecção por HPV e qual seria sua repercussão clínica, sugerindo a necessidade de mais investigações sobre o tema.

Um fator interessante observado na literatura é a associação entre a infecção por HPV e o prognóstico do paciente. A maioria dos estudos tem observado que os pacientes HPV-positivos apresentam melhor prognóstico que os HPV-negativo (GILLISON et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2001; RITCHIE et al., 2003). No estudo de Psyrris e DiMaio (2008), a presença de HPV conferiu uma redução no risco de morte ao paciente entre 60 à 80%.

Apesar de este estudo não ter inquirido sobre o comportamento sexual dos pacientes, pesquisas epidemiológicas têm mostrado uma associação entre a infecção por HR-HPV, o CECB e o comportamento sexual. Evidências têm mostrado

uma prevalência maior em indivíduos jovens, com vários parceiros e que praticam sexo oral ou anal (SMITH et al., 2004a e b; D'SOUZA et al., 2007; GILLISON et al., 2008).

Deve-se ressaltar que o tamanho da amostra deste estudo limitou a análise estatística, impedindo a realização de testes de associações que pudessem estabelecer a dependência significativa entre as variáveis estudadas. Um exemplo é a relação da infecção por HPV e o gênero do paciente. Apesar de 75% dos casos HPV-positivos (6/8) serem do gênero masculino, o teste de Fisher não foi capaz de estabelecer uma associação entre as variáveis ($p=0.66$).

O potencial oncogênico do HPV nos tumores da cabeça e pescoço é evidente pelos estudos revisados neste trabalho. Apesar da associação do vírus com o CEC da boca e da orofaringe, características histológicas e moleculares deste tumor ainda necessitam ser esclarecidas. As evidências científicas atuais demonstram que os tumores associados ao HPV expressam as proteínas E6 e E7, com suas respectivas ações (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). Ainda, que o CECB é uma doença multifatorial com, pelo menos, duas rotas distintas: a associação com o tabaco e o álcool e a associação com a infecção por HPV. Inúmeros estudos apresentados mostraram que a infecção pelo HPV e o fumo/álcool não é mutuamente exclusiva, ou se o tumor pode se desenvolver pela interação dos mesmos, e que esta diferença estaria relacionada com a localização do tumor. Estas questões devem ser respondidas para que se possam desenvolver programas não só de prevenção ao fumo e álcool, mas, talvez, de vacinação contra os HPVs oncogênicos mais prevalentes, da mesma forma que já se faz para com o câncer da cérvix uterina.

Estratégias de busca bibliográfica

O estudo utilizou para a presente revisão os bancos de dados *Medline* e *LILACS*, buscando artigos sobre a relação do HPV com o câncer bucal. Foram revisados estudos de 1983 até dezembro de 2008. Também houve uma busca por artigos que relacionavam o HPV no processo da carcinogênese e os testes moleculares de diagnóstico disponíveis.

As palavras-chaves utilizadas foram: CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS; BOCA; SONDAS DNA HPV.

Também foram compilados dados do INCA, Ministério da Saúde, que apresentavam as estimativas de incidência e de óbitos por Câncer de Boca para o ano de 2008.

Foram consultados livros, dissertações e teses publicadas de interesse para o estudo.

3.2 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram as seguintes conclusões de acordo com seus objetivos:

- a) O DNA do HPV estava presente em 47,1% da amostra;
- b) O tipo predominante foi o HR-HPV 16, presente em 100% dos casos positivos, sendo que, em um caso, se encontrava associado ao HPV 18 e, em outro, ao HPV 33;
- c) Não foi possível estabelecer uma associação significativa entre a infecção positiva ou negativa por HPV e a exposição ao tabaco ($p=0,43$) ou o consumo de álcool ($p=0,43$);
- d) A população foi composta, em sua maioria, por homens brancos, com idade igual ou superior a 65 anos, mais da metade era casada e não exercia atividade laboral. Quanto ao tabaco e ao álcool, a maioria era de fumante/ex-fumante e etilista/ex-etilista.

REFERÊNCIAS

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 Aug;23(4):271-4.

Al-Bakkal G, Ficarra G, McNeill K, Eversole LR, Sterrantino G, Birek C. Human papilloma virus type 16 E6 gene expression in oral exophytic epithelial lesions as detected by *in situ* rtPCR. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1999 Feb;87(2):197-208.

Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. **Arch Med Res**. 2008 Feb;39(2):189-97. Epub 2007 Nov 8.

Applebaum KM, Furniss CS, Zeka 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) Dec 5;99(23):1801-10.

Arrand JR, Harper DR. **Viruses and human cancer**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998.

Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. **Anticancer Res**. 2000 Mar-Apr;20(2B):1301-5.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**. 1988 Jun;48(11):3282-7.

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 Feb;35(2):86-90.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Dados sobre câncer bucal** [on line] 2008. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/boca>>. Acesso em: jan. 2008.

Bustos DA, Pavan JV, Carricart SE, Talavera AD, Secchi D, Carrica V et al. Detección del virus papiloma humano en lesiones cancerosas orales en la ciudad de Córdoba. **Rev Fac Cienc Méd (Córdoba)**. 1999;56(1):65-71.

Campisi G, Giovannelli L, Calvino F, Matranga D, Colella G, Di Liberto C et al. HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. **Oral Oncol**. 2006 Jul;42(6):638-45. Epub 2006 Feb 17.

Carmo EFS, Fiorini A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. **SaBios - Rev Saúde e Biol**. 2007;2(1):29-31.

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

Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen 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.

Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. **J Oral Pathol Med**. 1991 Aug;20(7):305-17.

Chang JY, Lin MC, Chiang CP. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Am J Clin Pathol**. 2003 Dec;120(6):909-16.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and –unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J Clin Oncol**. 2008 Feb 1;26(4):612-9.

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 May;10(3):163-6.

Cox MF, Scully C, Maitland N. Viruses in the aetiology of oral carcinoma? Examination of the evidence. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 1991 Dec;29(6):381-7.

Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer B Oral Oncol**. 1996 Jan;32B(1):55-62.

D'Costa J, Saranath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta AR. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. **Oral Oncol.** 1998 Sep;34(5):413-20.

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 May 10;356(19):1944-56.

Dabié MM, Hlupić L, Babić D, Jukić S, Seiwert S. Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification *in situ* hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. **Arch Med Res.** 2004 Nov-Dec;35(6):511-6.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. **Clin Cancer Res.** 2003 Jul;9(7):2620-6.

Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. **Head Neck.** 2008 Jan;30(1):75-84.

Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. **J Virol Methods.** 2008 Dec 16. [Epub ahead of print]

Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. **J Clin Oncol.** 2006 Jun 10;24(17):2606-11.

Franceschi S, Muñoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 1996 Jul;5(7):567-75.

Frazer IH, Leonard JH, Schonrock J, Wright RG, Kearsley JH. HPV DNA in oropharyngeal squamous cell cancers: comparison of results from four DNA detection methods. **Pathology.** 1993 Apr;25(2):138-43.

Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer.** 2007 Jun 1;120(11):2386-92.

Gallegos-Hernández JF, Paredes-Hernández E, Flores-Díaz R, Minauro-Muñoz G, Apresa-García T, Hernández-Hernández DM. Virus del papiloma humano asociado con cáncer de cabeza e cuello. **Cir Ciruj.** 2007 Mayo-Jun;75(3):151-55.

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

Gassenmaier A, Hornstein OP. Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. **Dermatologica.** 1988;176(5):224-33.

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 May 3;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 Mar 19;100(6):407-20. Epub 2008 Mar 11.

Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. **J Infec Dis.** 2002 Mar 15;185(6):833-6. Epub 2002 Feb 20.

González JV, Gutiérrez 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.

Greer RO Jr, Eversole LR, Crosby LK. Detection of human papillomavirus-genomic in oral epithelial dysplasias, oral smokeless tobacco-associated leukoplakias, and epithelial malignances. **J Oral Maxillofac Surg.** 1990 Nov;48(11):1201-5.

Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2004 Jul 1;15(4):188-96.

Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. **Acta Otolaryngol.** 2005 Dec;125(12):1337-44.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol.** 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.

Herrero R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive Tract. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2003;(31):47-51.

Herrero R, Castellsagué 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 Dec 3;95(23):1772-83.

Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clin Otorrhinol.** 2006 Aug;31(4):259-66.

Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. **Oral Oncol.** 2004 May;40(5):520-4.

Holladay EB, Gerald WL. Viral gene detection in oral neoplasms using the polymerase chain reaction. **Am J Clin Pathol.** 1993 Jul;100(1):36-40.

Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. **Arch Pathol Lab Med.** 2003 Aug;127(8):940-5.

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 Mar;99(3):311-5.

Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. **Acta Virol.** 2003;47(1):11-6.

Kansky AA, Seme K, Maver PJ, Luzar B, Gale N, Poljak M. Human papillomaviruses (HPV) in tissue specimens of oral squamous cell papillomas and normal oral mucosa. **Anticancer Res.** 2006 Jul-Aug;26(4B):3197-201.

Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyryn Kangas K, Soini Y, Alho OP et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. **Br J Cancer.** 2000 Sep;83(5):614-9.

Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of oral cavity. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 1990 Jan;99(1):55-61.

Koppikar P, deVilliers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. **Int J Cancer**. 2005 Mar 1;113(6):946-50.

Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. **J Infect Dis**. 2004 Feb 15;189(4):686-98. Epub 2004 Feb 2.

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

La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol**. 1997 Sep;33(5):302-12.

Lakshmi S, Nair SA, Pillai MR. Oral Cancer and human papillomaviruses: is there a Link? **J Surg Oncol**. 1993 Mar;52(3):193-6.

Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. **J Oral Pathol Med**. 2004 May;33(5):260-3. Comment in: *J Oral Pathol Med*. 2005 Jan;34(1):62-3; author reply 63-4.

Lazzari CM. **Freqüência de papilomavírus humano em lesões epiteliais de boca** [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.

Li G, Sturgis EM. The role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Curr Oncol Rep**. 2006 Mar;8(2):130-9.

Liang XH, Lewis J, Foote R, Smith D, Kademani D. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic Experience. **J Oral Maxillofac Surg**. 2008 Sep;66(9):1875-80.

Lo Muzio L, Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Greco I, Staibano S et al. HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship? **Oral Oncol**. 2004 Aug;40(7):736-41.

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. **J Invest Dermatol.** 1985 May;84(5):417-20.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol.** 1992 Mar;79(3):328-37.

Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, Sherman KJ, Ashley RL et al. Human papillomaviruses, herpes simples viruses, and the risk of oral cancer in men. **Am J Epidemiol.** 1992 May 15;135(10):1093-102.

Madkan VK, Cook-Norris RH, Steadman MC, Arora A, Mendoza N, Tyring SK. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **Br J Dermatol.** 2007 Aug;157(2):228-41. Epub 2007 Jun 6. Erratum in: *Br J Dermatol.* 2007 Sep;157(3):634-5.

Maitland NJ, Bromidge T, Cox MF, Crane IJ, Prime SS, Scully C. Detection of human papillomavirus genes in oral tissue biopsies and cultures by polymerase chain reaction. **Br J Cancer.** 1989 May;59(5):698-703.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006 Jul;102(1):67-76. Epub 2006 Jan 10.

McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. **Clin Lab Med.** 2000 Jun;20(2):383-406.

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

Meanwell CA, Cox MF, Blackledge G, Maitland NJ. HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implications for behaviour of cervical neoplasia. **Lancet.** 1987 Mar 28;1(8535):703-7.

Merletti F, Boffetta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B. Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. **Cancer Res.** 1989 Sep 1;49(17):4919-24.

Milde K, Löning T. Detection of papillomavirus DNA in oral papillomas and carcinomas: application of in situ hybridization with biotinylated HPV 16 probes. **J Oral Pathol.** 1986 May;15(5):292-6.

Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1996 Jul;82(1):57-68. Comment in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Feb;83(2):187-8.

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 Jun;91(6):622-35. Comment in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):125-6.

Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med.** 2001 Apr 12;344(15):1125-31. Comment in: *N Engl J Med.* 2001 Aug 2;345(5):376-7. *N Engl J Med.* 2001 Aug 2;345(5):376; author reply 377. *N Engl J Med.* 2001 Aug 2;345(5):376; author reply 377.

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **J Virol.** 2004 Nov;78(21):11451-11461.

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

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.** 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.

Oliveira D, Odell E. Diagnóstico precoce e prevenção do câncer de boca. In: Buischi Y. **Promoção de saúde bucal na clínica odontológica.** São Paulo: Artes Médicas, 2000. p. 279-293.

Ord RA, Blanchaert RH, editores. **Oral cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation, and prevention.** China: Quintessence Books, 2000.

Palefsky JM, Silverman S Jr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. **J Oral Pathol Med.** 1995 May;24(5):193-7.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editores. **Cancer incidence in five continents.** Lyon: IARC Scientific Publications, 2002.

Perrone M, Premoli-de-Percoco G. Papilomavirus humanos: asociacion con ciertas lesiones de la cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.** 1992 Ene-Ago;30(1-2):59-62.

De Petrini M, Rittà M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C et al. Head and neck squamous cell carcinoma: role of the human papillomavirus in tumour progression. **New Microbiol.** 2006 Jan;29(1):25-33.

Phillips AC, Vousden KH. Human papillomaviruses and cancer. In: Arrand JR, Harper DR. **Viruses and human cancer.** Washington: Bios Scientific Publishers, 1998. p. 39-64.

Pillai MR, Phanidhara A, Kesari AL, Nair P, Nair MK. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in the oral mucosa. **J Surg Oncol.** 1999 May;71(1):10-5.

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 Mar;44(3):242-50. Epub 2007 Apr 27.

Premoli-De-Percoco G, Ramirez JL. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. **J Oral Pathol Med.** 2001 Jul;30(6):355-61.

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

Queiroz LB. **Avaliação da expressão das proteínas p53 e pRb em carcinoma escamocelular e papilomas orais pelo método imuno-histoquímico** [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2006.

Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. **Int J Cancer.** 2007 Oct 15;121(8):1813-20.

Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. **J Dent Res.** 2007 Feb;86(2):104-14.

Regezi J, Sciubba J. **Patologia bucal: correlações clinicopatológicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Ries LAG. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Disponível em: < http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/ > Acesso em: jan. 2009.

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer.** 2003 Apr 10;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 Jan-Mar;20(1):21-4. Epub 2006 May 22.

Scapoli L, Palmieri A, Rubini C, Martinelli M, Spinelli G, Ionna F et al. Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper. **Mod Pathol.** 2009 March 22(3):366-72.

Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology.** 2005 Jun 20;337(1):76-84.

Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst.** 1998 Nov 4;90(21):1626-36. Comment in: J Natl Cancer Inst. 1998 Nov 4;90(21):1585-6.

Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2001 Jul;125(1):1-9.

Sciubba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. **J Am Dent Assoc.** 2001 Nov;132 Suppl:12S-18S. Erratum in: J Am Dent Assoc 2002 Apr;133(4):422.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma(SCCHN):1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol.** 2000 May;36(3):256-63.

Scully C, Cox MF, Prime SS, Maitland NJ. Papillomavirus: the current status in relation to oral disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1988 May;65(5):526-32.

Scully C. Oral cancer: the evidence for sexual transmission. **Br Dent J.** 2005 Aug 27;199(4):203-7.

Shafer W, Hine M, Levy B. **Tratado de patologia bucal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

Shroyer KR, Greer RO Jr. Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1991 Jun;71(6):708-13.

Siebers TJ, Merckx MA, Slootweg PJ, Melchers WJ, van Cleef P, de Wilde PC. No high-risk HPV detected in SCC of the oral tongue in the absolute absence of tobacco and alcohol – a case study of seven patients. **Oral Maxillofac Surg.** 2008 Dec;12(4):185-8.

Silva CE, 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 Oct;104(4):497-500. Epub 2007 Jul 25.

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 Nov;37(10):593-8.

Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G et al. Human papillomavirus infection in “young” versus “old” patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck.** 2000 Oct;22(7):649-57.

Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. **Laryngoscope.** 1998 Jul;108(7):1098-103.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. **Int J Cancer**. 2004a Feb 20;108(5):766-72.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst**. 2004b Mar 17;96(6):449-55. Comment in: *J Natl Cancer Inst*. 2004 Aug 4;96(15):1181-2; author reply 1182-3

Soares CP, Malavazi I, Reis RI, Neves KA, Zuanon JÁ, Benatti Neto C et al. Presença do papilomavirus humano em lesões malignas de mucosa oral. **Rev Soc Brasil Med Trop**. 2007 Set-Out; 35(5):439-44.

Steinau M, Swan DC, Unger ER. Type-specific reproducibility of the Roche linear array HPV genotyping test. **J Clin Virol**. 2008 Aug;42(4):412-4. Epub 2008 Apr 18.

Stevens MP, Garland SM, Rudland E, Tan J, Quinn MA, Tabrizi SN. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. **J Clin Microbiol**. 2007 Jul;45(7):2130-7. Epub 2007 May 9.

Sugerman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a casual relationship. **Oral Dis**. 1997 Sep;3(3):130-47.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV 18 in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2003 May;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 Mar;45(2):116-22. Epub 2006 Jun 15.

Sundfeld M. **Análise de sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de boca, em Araçatuba, de 1980 a 1995 [tese]**. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1999.

Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg MA, Pyrhönen S. Human Papillomavirus (HPV) Involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. **Proc Finn Dent Soc**. 1983a;79(1):1-8.

Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. **Br J Oral Surg.** 1983b Jun;21(2):147-53.

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

Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. **Med Microbiol Immunol.** 2003 Aug;192(3):123-8. Epub 2003 Jan 18.

Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Happonen RP, Lamberg MA. In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosa lesions. **Arch Dermatol Res.** 1987;279(8):543-9.

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: review. **J Clin Virol.** 2005 Mar;32 Suppl 1:S59-66.

Tachezy R, Klozar J, Saláková 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 May;11(3):181-5.

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 Oct;19(10):1681-90. Epub 2008 Jun 16.

Tinoco JA, Silva AF, Oliveira CA, Rapoport A, Fava AS, Souza RP. Correlação da infecção viral pelo papilomavírus humano com as lesões papilomatosas e o carcinoma epidermóide na boca e orofaringe. **Rev Assoc Med Bras.** 2004 Jul-Set;50(3):252-56.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncol.** 2007 Jul;43(6):523-34. Epub 2007 Jan 26.

UOBE, K. et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. **Oral Oncol.** 2001 Feb;37(2):146-52.

Vidal AKL, Caldas Jr AF, Brandão VRA, Rocha GI, Taromaru E, Lima

DLT et al. Detecção do papilomavírus humano (HPV) pela captura híbrida® (tecnologia digene) em lesões malignas da cavidade bucal. **Odontologia Clin Cientif.** 2001 Jul-Dez;4(2):129-36.

Vidal AKL, Caldas Jr AF, Mello RJV, Brandão VR, Rocha GI, Taromaru E. HPV detection in oral carcinomas. **J Bras Patol Med Lab.** 2004 Jan-Fev;40(1):21-26.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol.** 1999 Sep;189(1):12-9. Comment in: *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):1-3.

Wallin, KL, van Doornum GJ, Andersson-Ellström A, Kallings I, Wiklund F, Hallmans G et al. Seroepidemiology of human papillomavirus type 73: a sexually transmitted low-risk virus. **Int J Cancer.** 2000 Feb 1;85(3):353-7.

Watts SL, Brewer EE, Fry TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1991 Jun;71(6):701-7

WHO. Epidemiology. Disponível em:
<http://www.who.int/oral_health/publications/CDOE05_vol33_397_9/en/> Acesso em: Jan. 2009.

Woo YL, Damay I, Stanley M, Crawford R, Sterling J (2007). The use of HPV linear array assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. **J Virol Methods.** 2007 Jun;142(1-2):226-30. Epub 2007 Feb 23

Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storthz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med.** 1993 Mar;22(3):101-8.

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

Yeudall WA, Campo MS. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. **J Gen Virol.** 1991 Jan;72 (Pt 1):173-6.

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 Jan;33(1):71-4

zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. **Bibl Haematol.** 1975 Oct;(43):569-71

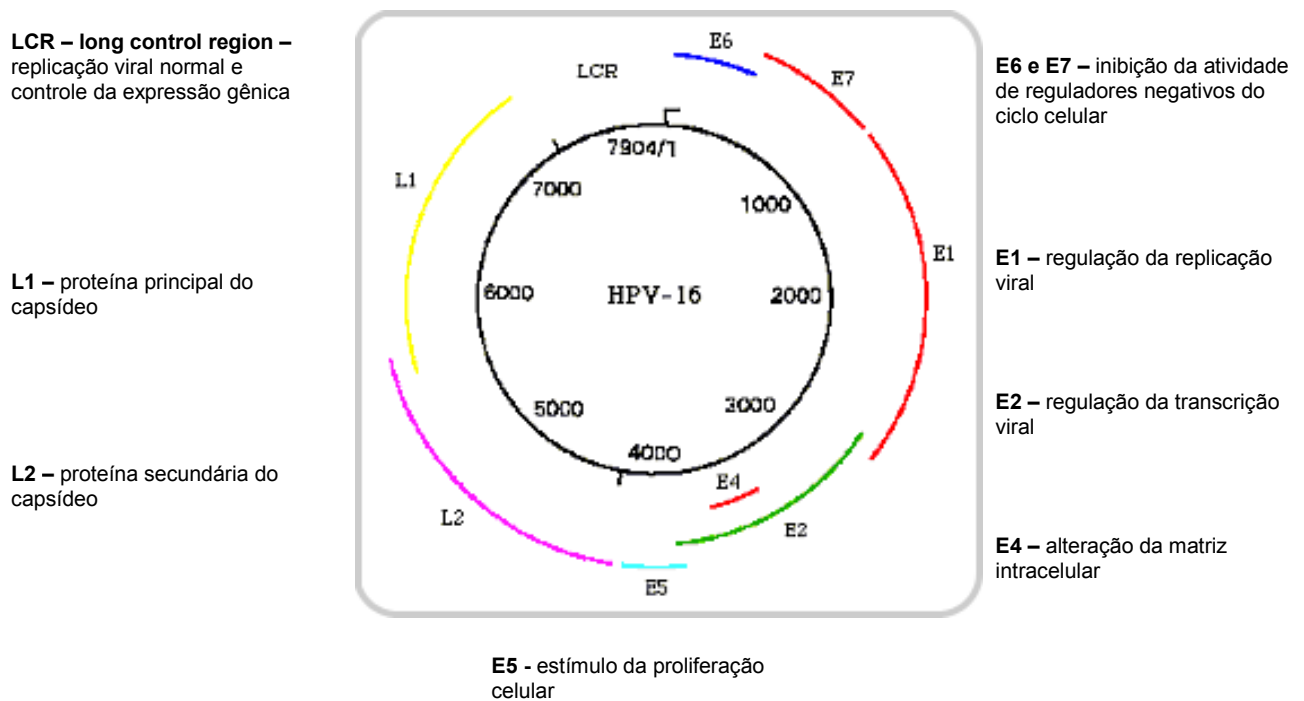
zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst.** 2000 May 3;92(9):690-8

zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. **Annu Rev Microbiol.** 1994;48:427-47

ANEXOS

ANEXO 1 – Genoma do HPV 16.

Figura 1. Organização do genoma do HPV 16 com as funções das proteínas virais. (Fonte: adaptado de <http://www.citocamp.com.br/hpv/hpv.html>).



ANEXO 2



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 686/04-CEP

Porto Alegre, 14 de setembro de 2004.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Estudo molecular de papilomavírus humano 16 e 18 em lesões de carcinoma espinocelular bucal".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dout Myriam Camara Brew
N/Universidade

ANEXO 3a - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO ESTUDO MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM LESÕES DE CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL**I- Objetivo e justificativa da pesquisa:**

A cavidade bucal pode apresentar uma variedade de alterações. Dentre essas está o carcinoma espinocelular bucal. O conhecimento de como ele ocorre é muito importante para a sua prevenção e seu tratamento. Por meio desta pesquisa, gostaríamos de entender melhor a maneira como ele acontece. Isto será feito pelo estudo de uma amostra de sua lesão, que será removida por indicação clínica, e de uma amostra de células raspadas da sua boca com uma escova especial.

II- O procedimento de coleta:

Para realizar esta pesquisa, utilizaremos uma pequena parte da lesão removida durante o procedimento de biópsia que o Sr.(a) será submetido por indicação clínica. Como rotina, a outra parte da lesão será examinada para que se saiba qual é o diagnóstico da lesão que o Sr.(a) apresenta. Esse material coletado será congelado para ser eventualmente utilizado em pesquisas que poderão trazer novos conhecimentos sobre a sua lesão. Como será aproveitada uma parte da lesão que terá que ser removida, não haverá nenhum desconforto para o Sr.(a) além daquele causado pela própria biópsia.

III- Ficha de coleta e privacidade:

Os dados referentes à sua pessoa e ao resultado do estudo de sua lesão serão anotados em uma ficha de coleta não identificada e numerada elaborada por mim. Essa ficha ficará em meu poder, com a garantia que não será divulgada durante a pesquisa, no trabalho final e nem posteriormente.

IV- Benefícios e Dúvidas:

Talvez os resultados desta pesquisa não lhe tragam benefícios diretos, mas saberemos mais sobre a doença que o Sr.(a) possui, o que ajudará outras pessoas. Outrossim, comprometo-me, se o senhor assim o desejar, de lhe fornecer os resultados dos dados investigados.

Qualquer dúvida que o (a) Sr.(a) tiver, não receie em perguntar quantas vezes precisar.

VI- Descobertas:

Caso seja descoberta alguma informação sobre a sua lesão que possa ter influência no diagnóstico ou tratamento, o Sr.(a) deseja ser informado?

() SIM

() NÃO

VII- Abandono:

Caso o (a) Sr.(a) não deseje participar da pesquisa, seu material coletado, não será utilizado, e em nada mudará o tratamento a que está se submetendo. Caso a utilização tenha sido realizada e quiser ser excluído (a) da pesquisa, poderá fazê-lo a qualquer momento.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido (a) e dos resultados esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento da participação da pesquisa, a qualquer momento.

A pesquisadora Myrian Camara Brew certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo posso chamar Myrian Camara Brew pelos telefones: 3320 3000 ramal 2554 ou 9982.1569. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado (a), posso chamar a chefe do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, Dr^a. Liliane Soares Yurgel pelo telefone 3320 3000 ramal 2554.

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Informado.

Nome do Paciente/RG	Assinatura

_____ **Porto Alegre, ____ de _____, _____.**


Pesquisadora: Myrian Camara Brew

Cirurgia-dentista CRO - 6500

Este formulário foi lido para _____ em ____/____/____
enquanto eu estava presente.

Testemunha: Nome	Assinatura

ANEXO 3b



SERVIÇO DE ESTOMATOLOGIA
HOSPITAL SÃO LUCAS DA PUC

Nome: _____ FICHA: __

Você tem indicação para ser submetido a uma cirurgia oral menor, sob anestesia local, dia ___/___/___, àshoras e abaixo estão relacionados alguns esclarecimentos para seu conhecimento.

Qualquer dúvida entre em contato conosco pelo telefone:
33.20.3254

Data:

Assinatura do paciente ou responsável
Data:

Outrossim, autorizo, após o diagnóstico final, o uso do material coletado na biópsia para pesquisa de doenças da boca utilizando histopatologia, imunologia ou biologia molecular

ANEXO 4 – ficha de coleta de dados

Paciente: _____

Endereço: _____

Data: ____/____/200____

Cidade: _____ UF: _____

Fone para contatos: _____ Prontuário: _____

Controle: _____

Data nascimento: ____/____/____

Idade: ____

Gênero: ____ (1) Masculino ____ (2) Feminino

Profissão: ____ (1) Pescador/marinheiro ____ (3) Construtor civil

____ (2) Trabalhador rural ____ (4) Esportista

____ (5) Servidor municipal ____ (6) Outros: _____

____ (8) NSA

Aposentado de:

____ (1) Pescador/marinheiro ____ (3) Construtor civil

____ (2) Trabalhador rural ____ (4) Esportista

____ (5) Servidor municipal ____ (6) Outros: _____

____ (8) NSA

Estado civil:

____ (1) casado ____ (2) solteiro ____ (3) viúvo ____ (4) separado

____ (5) ajuntado ____ (6) outros

Etnia: ____ (1) Branca ____ (2) Negra ____ (3) Mista ____ (4) outra

HÁBITOS/FUMANTE

1.- Fumante atualmente? ____ (1) Sim ____ (2) Não

2.- SE SIM, há quanto tempo ?

____ (1) 1 - 10 anos ____ (8) NSA

____ (2) 11 - 15 anos

____ (3) 16 ou mais

3.- SE SIM, o que fuma?

____ (1) cigarros industrializados ____ (4) charutos

____ (2) palheiros ____ (5) fumo de mascar

____ (3) cachimbo ____ (8) NSA

4. SE SIM, quantidades de unidades fumadas por dia:

____ (1) 1 - 5 ____ (2) 6 - 10 ____ (3) 10 - 20 ____ (4) +20 ____ (8) NSA

5.- Fumou no passado? ____ (1) Sim ____ (2) Não ____ (8) NSA

6.- SE SIM, por quanto tempo fumou ?

____ (1) 1 - 10 anos ____ (2) 11 - 15 anos

____ (3) 16 ou mais ____ (8) NSA

7.- SE SIM, o que fumou?

____ (1) cigarros industrializados ____ (4) charutos

____ (2) palheiros ____ (5) fumo de mascar

____ (3) cachimbo ____ (8) NSA

8. SE SIM, Quantidades de unidades fumadas por dia:

___ (1) 1 - 5 ___ (2) 6 - 10 ___ (3) 10 - 20 ___ (4) +20 ___ (8) NSA

9- Há quanto tempo parou por fumar:

___ (1) 1 - 10 anos ___ (2) 11 - 15 anos
___ (3) 16 ou mais ___ (8) NSA

HÁBITOS/ALCOOL

10.- Toma bebida alcoólica? ___ (1) Sim ___ (2) Não

11.- SE SIM, há quanto tempo?

___ (1) 1 - 10 anos ___ (2) 11 - 15 anos
___ (3) 16 ou mais ___ (8) NSA

12.- SE SIM, qual tipo?

___ (1) Bebidas destiladas (cachaça, whisky, vodka)
___ (2) Bebidas fermentadas (cerveja, vinho) ___ (8) NSA

13.- SE SIM, qual a frequência?

___ (1) Diariamente ___ (2) 3 vezes por semana
___ (3) 2 ou menos ___ (4) 1 vez por mês
___ (8) NSA

14.- Bebeu no passado? ___ (1) Sim ___ (2) Não ___ (8) NSA

15.- SE SIM, por quanto tempo?

___ (1) 1 - 10 anos ___ (2) 11 - 15 anos
___ (3) 16 ou mais ___ (8) NSA

16.- SE SIM, qual tipo?

___ (1) Bebidas destiladas (cachaça, whisky, vodka)
___ (2) Bebidas fermentadas (cerveja, vinho) ___ (8) NSA

17.- SE SIM, com que frequência?

___ (1) Diariamente ___ (2) 3 vezes por semana
___ (3) 2 ou menos ___ (8) NSA

18- Há quanto tempo parou de beber:

___ (1) 1 - 10 anos ___ (2) 11 - 15 anos
___ (3) 16 ou mais ___ (8) NSA

CECBUCAL

Local da lesão de CECB? _____

Grau do tumor: () I () II () III () IV

INFECÇÃO POR HPV

Presença do DNA viral ___ (1) Sim ___ (2) Não

Tipo: HPV _____ 8 (NSA)

ANEXO 5 – Confirmação de submissão ao periódico Oral Diseases

From: odiedoffice@wiley.com

To: mcbrew@terra.com.br

CC:

Subject: Author submission confirmation ODI-03-09-OM-1216

Body: 13-Mar-2009

Dear Author of "Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma in a south Brazilian population",

The manuscript entitled "Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma in a south Brazilian population" has been submitted by Miss Myrian Brew to Oral Diseases and is presently being given full consideration for publication.

You have been listed as author for the manuscript. If this is not the case, please reply to this email.

Sincerely,

Oral Diseases Editorial Office

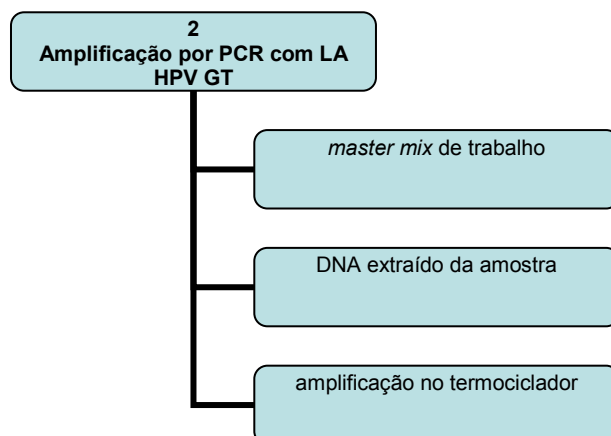
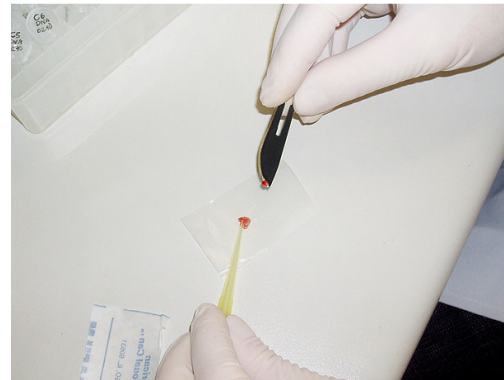
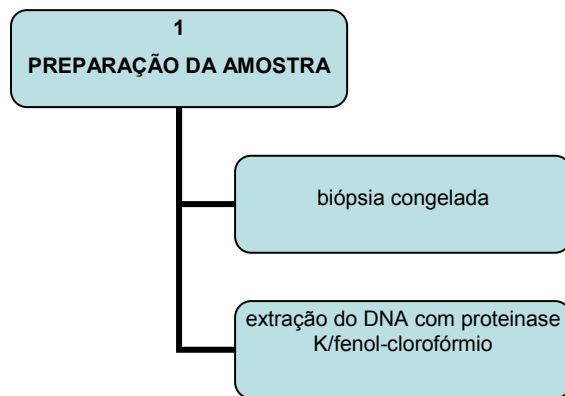
Date Sent: 13-Mar-2009

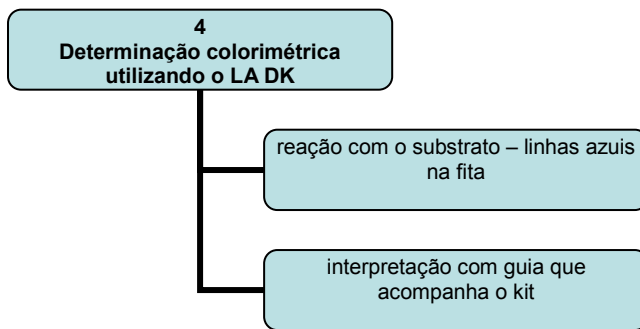
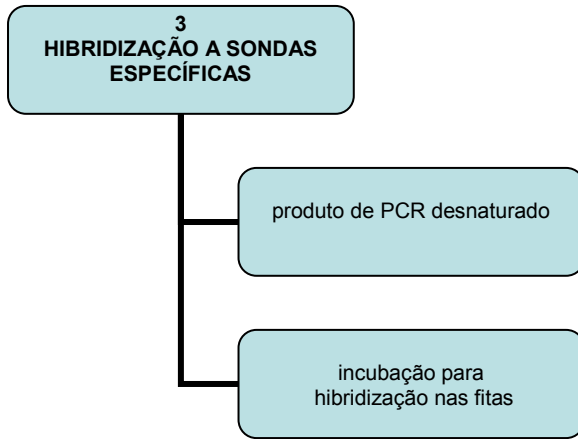
APÊNDICE

Resumo esquemático da metodologia do Sistema de Diagnóstico da Roche

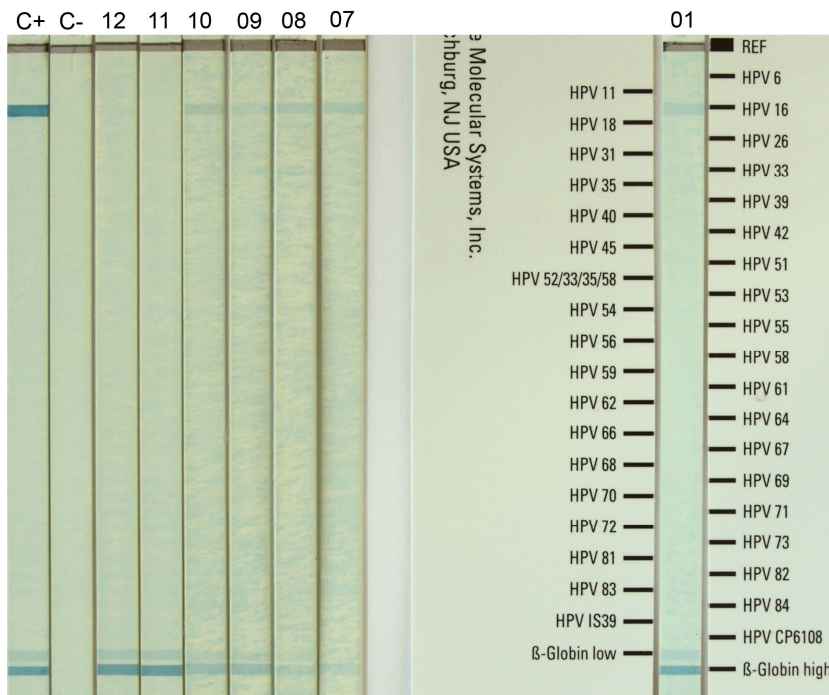
O teste de genotipagem *Linear Array* (LA HPV GT) está baseado em quatro procedimentos principais que incluem: (1) preparação da amostra, (2) amplificação por PCR do DNA alvo, (3) hibridização dos produtos amplificados em sondas tipo-específicas (hibridização reversa), e (4) detecção dos produtos amplificados por determinação colorimétrica, utilizando o *Linear Array Detection Kit* (LA DK).

RESUMO ESQUEMÁTICO





Interpretação:



C⁺ - HPV 16, β -globina forte, β -globina fraca
C⁻ - nenhuma banda
 Amostra 12 – HPV negativo
 Amostra 11 – HPV negativo
 Amostra 10 – HPV 16
 Amostra 09 – HPV 16
 Amostra 08 – HPV 16
 Amostra 07 – HPV 16
 Amostra 01 – HPV 16