

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/01/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de concentração: Estomatologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

SAYGO TOMO

**HPV-16 DNA DETECTION IN FRESH TISSUE, SALIVA AND
PLASMA OF PATIENTS WITH ORAL LEUKOPLAKIA BY
REAL TIME PCR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Araçatuba – SP

2017

SAYGO TOMO

HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and plasma of patients with oral leukoplakia by real time PCR

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador: Professor Titular Glauco Issamu Miyahara.

Co- orientadores: Professor Assistente Doutor Daniel Galera Bernabé.

Professora Doutora Kellen Cristine Tjioe.

Araçatuba - SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T661h

Tomo, Saygo.

HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and plasma of patients with oral leukoplakia by real time PCR / Saygo

Tomo. – Araçatuba, 2018

44 f.: il. 1; tab. 2

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara

Coorientador: Prof. Daniel Galera Bernabé

Coorientadora: Profa. Kellen Cristine Tjioe

1. Leucoplasia 2. Papillomaviridae 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real I. T.

Black D6

CDD 617.63

Claudio Hideo Matsumoto

CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico este trabalho e a alegria deste momento...

À minha irmã, **Kamila Sayuri Tomo**, quem me ensinou o significado de amor incondicional e a quem devo ser exemplo.

Aos meus pais, **Manriki Tomo** e **Juzelda Pereira da Silva**, que nunca mediram esforços para a concretização dos meus sonhos.

A minha amiga **Juanitta S. L. Tomo**, que me recebeu como um filho, e dedicou a mim amor e cuidados especiais.

Aos pacientes que por meio da doença colaboram com a ciência na busca de melhor entendimento dos processos patológicos.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, por aceitar o desafio de me orientar nesse trajeto, pela paciência durante estes anos perante minhas dificuldades, limitações e anseios, e pelo constante incentivo pela busca do conhecimento acadêmico, clínico e de crescimento pessoal, que foram extremamente importantes na minha formação. Minha eterna gratidão.

Ao meu co-orientador **Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé**, por compartilhar seu conhecimento e experiência, pelo estímulo ao processo de aprendizado e sedimentação do conhecimento. Pelos profundos questionamentos que estimulam o senso crítico e impulsionam o desejo pela pesquisa.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Kellen Cristine Tjioe**, por ser um exemplo de dedicação e conduta acadêmica, pelos conselhos, incentivos e auxílio nas diferentes e desafiadoras fases do curso de mestrado, e por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência, meus mais sinceros agradecimentos.

À **Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira**, agradeço pela parceria, e por dispor dos recursos necessários para a realização dos estudos em nossa equipe. Agradeço também pela paciência e incentivo, e por ser um exemplo de docente a ser seguido.

Ao **Prof. Adj. Éder Ricardo Biasoli**, muito obrigado pela colaboração na minha formação clínica e científica, compartilhando experiências, aplicando incentivos e dando oportunidades.

Devo nada menos do que gratidão e amor por minha eterna mentora e amiga **Profa. Dra. Luciana Estevam Simonato**. Obrigado, Lú, por acreditar em mim, dispor de todas as oportunidades ao seu alcance durante estes seis anos de convívio. Obrigado pela paciência frente aos meus anseios e limitações, e por cada palavra de conforto e incentivo. Obrigado pela convivência e amizade. Receio jamais ser capaz de expor toda gratidão por ter em minha vida.

Agradecimentos

Aos meus avós, **José e Elza** (*in memoriam*), e **Toshimoto** (*in memoriam*) e **Yoshi** (*in memoriam*), as bases dos valores que chegaram a mim e permitiram minha formação pessoal e profissional.

Aos meus tios, **Fernanda e Lemuel**, muito obrigado pelo incentivo em me apegar a Fé, aos estudos, e por serem grandes referências para minha vida.

Aos meus tios **Yukio e Yolanda, Laércio e Nadina**, exemplos de amor, honestidade, dedicação e inteligência, muito obrigado.

Agradeço de coração às minhas grandes amigas **Sâmia Queiroz, Nahyla Macedo, Sara Castro e Anna Laura Souza**, por todos os anos de amizade e companheirismo, e acima de tudo, por estarem ao meu lado em todos os momentos em que mais precisei de apoio e aceitação. Amo esse “**Povo Colega**” como se fosse família. Torço pelo sucesso e felicidade de cada uma de vocês, e vibro por cada conquista e alegria como se fossem minhas.

As amigas e parceiras de pesquisa **Lígia Lavezo Ferreira, Ingrid da Silva Santos, e Jéssica Araújo Figueira**, muito obrigado pela amizade construída, pelo convívio e as inúmeras vezes que, prontamente, me ajudaram. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho e tornaram os momentos mais descontraídos e divertidos. São verdadeiros amigos, irmãos que recebi de presente de Deus e que vou levar sempre em meu coração!

Aos amigos da pós-graduação, **Bruna Amélia Serafim, Flávia Alves Verza, Vítor Bonetti Valente, Daniela Brito Bastos e Stephanye Pinto Biss**, muito obrigado pela amizade, por tornarem os momentos mais alegres, pelo

aprendizado compartilhado e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho. Com vocês tudo se tornou mais fácil.

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, representado pela **Prof.^a Ana Claudia Okamoto** e **Prof.^a Cristiane Furuse**. Aos docentes, **Prof.^a Ana Maria Soubhia**, **Prof. Marcelo Crivelini**, **Prof.^a Leda Maria Salzedas**, **Prof.^a Renata Callestini Felipini** e **Prof.^a Agnes Assao** pelos conhecimentos transmitidos, pela calorosa recepção no departamento, por todo carinho e preocupação comigo. Aos funcionários, Adriana de Paula e Marli Santos por toda gentileza e auxílio prestado.

A toda equipe e quadro de funcionários do Centro de Oncologia Bucal, Unidade Auxiliar de Estrutura Simples, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, **Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva**, **Jefferson Gardenal Teixeira**, **Janaína Zavitoski da Silva**, **Suzy Elaine Nobre de Freitas**, **Anne Cristina de Faria Cocato**, **Daniene Tesoni Cassavara Ribeiro**, **Regiane Mazzariolli Pereira Nogueira**, **Gabrielle Dias Duarte** e **Sabrina Macedo**, pelas conversas distraídas, amizade, palavras de incentivo e auxílio oferecido e prestados em vários momentos, o meu muito obrigado. Vocês são parte da minha família em Araçatuba. Sou extremamente grato pela amizade e pela convivência com cada um de vocês.

Aos meus amigos de longa data e colegas de graduação **Nathália**, **Myllena**, **Deysiane** e **Kawhan**, pelo companheirismo e compartilhamento de experiências, nos bons e maus momentos. Meu muito obrigado.

Aos amigos de Campinas, **Rita de Cássia, Carlos Renato, Gabriela e Glaucon**, minha eterna gratidão pelos longos anos de amizade e apoio em todos os momentos em que precisei.

Meu muito obrigado aos meus eternos Professores e amigos **Mônica Kina, Marlene Cruz, Karina Fernandes, Derly Oliveira, André Fabris e Elisa Sartori**, por estarem sempre dispostos em me ensinar e pelos valiosos conselhos e apoio.

A equipe do laboratório de Farmacologia, especialmente a **Aline Takamiya e Victor Balera** por toda ajuda e gentileza em todos os momentos que precisei de auxílio durante a realização dos experimentos.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FOA - UNESP, **Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada** por toda a disponibilidade, pelo enorme auxílio prestado em todas as etapas deste curso e, por toda a paciência e dedicação de vocês.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa do atual Diretor, **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e do Vice-Diretor, **Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho**, instituição que me recebeu de braços abertos e que foi fundamental para me tornar o ser humano e profissional que sou hoje! Agradeço por todos os momentos vividos aqui e levo cada um em meu coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do coordenador, **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Demanda Social (DS) concedida a mim, que foi de extrema importância para minha manutenção durante o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio de pesquisa regular concedido à nossa equipe (Processo: 2016/12982-0), sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

Epígrafe

“É preciso tentar não sucumbir sob o peso de nossas angústias, e continuar a lutar.”

*- (Harry Potter e o Enigma do Príncipe)
J.K. Rowling*

Tomo S. Detecção do DNA do HPV-16 em tecido fresco, saliva e plasma sanguíneo de pacientes com leucoplasia bucal pela *Real Time* PCR. [dissertation]- Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2017.

Resumo

Objetivo: Avaliar a presença do HPV-16 em tecido fresco, saliva e plasma sanguíneo de pacientes com leucoplasia bucal pela *real time* PCR na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Pacientes e métodos:** Trinta e sete pacientes com diagnóstico de leucoplasia bucal foram incluídos no estudo. Destes, foram obtidos dados sociodemográficos, clinicopatológicos, estilo de vida e amostras de tecido fresco, sangue e saliva que foram armazenados a -80°C para posterior análise molecular. Os materiais obtidos destes pacientes foram submetidos à detecção do DNA viral pela técnica da *real time* PCR com sonda específica para o HPV-16. **Resultados:** Dos 37 pacientes incluídos no estudo, 64,8% eram homens e a idade variou de 25 a 82 anos, com uma média de 58,72 anos. Dezesesseis pacientes (43,2%) eram idosos e 43,2%, adultos de meia idade, e apenas 13,6%, adultos jovens. A maioria dos pacientes era fumante (72,9%), sendo que 16,3% eram ex-fumantes e 10,8%, não fumantes. Da mesma forma, a maioria (62,2%) era etilista, 21,6%, ex-etilistas e 16,2%, não-etilistas. Vinte e sete por cento das lesões apresentaram algum grau de displasia epitelial. A detecção do HPV-16 pela PCR em tempo real não foi positiva para nenhuma amostra, resultando em um índice de 0% de detecção. **Conclusão:** O HPV-16 não foi identificado na população estudada. No entanto, outros subtipos do HPV de baixo e alto risco podem estar associados à ocorrência de leucoplasia bucal nesta população, o que requer novas investigações. Estudos epidemiológicos mais amplos são necessários para esclarecer a variabilidade geográfica na prevalência do HPV no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e lesões bucais potencialmente malignizáveis.

Palavras-chave: Leucoplasia, Papillomaviridae, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Tomo S. HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and plasma of patients with oral leukoplakia by real time PCR. [dissertation]- Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2017.

Abstract

Objective: To evaluate the prevalence of HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and blood plasma from patients with oral leukoplakia by the real time PCR in the northwest region of the São Paulo state, Brazil. **Patients and methods:** Thirty-seven patients diagnosed with oral leukoplakia were included in the study. Sociodemographic, clinicopathologic and lifestyle data, fresh tissue, saliva and blood plasma samples were collected. Biologic material was stored at -80°C and then submitted to viral DNA detection by the real time PCR technique with a probe specific for HPV-16. **Results:** Of the 37 patients included in the study, 64.8% were men, and the age ranged from 25 to 82 years, with a mean of 58.72. Sixteen patients (43.2%) were elderly, 43.2% were middle-aged adults, and only 13.6% were young adults. Most patients were smokers (72.9%), 16.3% were former smokers, and 10.8% were non-smokers. Most patients (62.2%) were current drinkers, 21.6% were ex-drinkers and 16.2% were non-drinkers. Twenty seven percent of the lesions presented some degree of dysplasia. HPV-16 detection by real-time PCR was not positive for any sample, resulting in a 0% detection rate. **Conclusion:** The HPV-16 was not identified in the population studied. However, other low and high-risk HPV subtypes might be associated to the occurrence of oral leukoplakia in this population, which requires further investigations. Broader epidemiological studies are required to clarify the geographic variability in the prevalence of HPV in head and neck squamous cell carcinoma and oral potentially malignant lesions.

Keywords: Leukoplakia; Papillomaviridae; Real-Time Polymerase Chain Reaction.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Flowchart of the study

20

LIST OF TABLES

Table 1.	Sociodemographic, lifestyle, clinicopathological characteristics and HPV-16 detection results of patients with oral leukoplakia	25
Table 2.	Prevalence of HPV in oral leukoplakia in the last 10 years	27

LIST OF ABBREVIATIONS

HPV, Human Papillomavirus

HNSCC, Head and neck squamous cell carcinoma

OPML, Oral potentially malignant lesions

OL, Oral leukoplakia

DNA, Deoxyribonucleic acid

OSCC, Oral squamous cell carcinoma

UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

FFPE, Formalin fixed paraffin embedded

EDTA, Ethylenediamine tetraacetic acid

IPC, Internal positive control

nPCR, Nested polymerase chain reaction

ISH, *in situ* hybridization

RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction

IHQ, Immunohistochemistry

qPCR, Quantitative polymerase chain reaction

SCC, Squamous cell carcinoma

SUMMARY

Introduction.....	19
Patients and Methods.....	20
Results	25
Discussion	27
References.....	33
Annex A.....	41
Annex B.....	43
Annex C.....	44

HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and plasma of patients with oral leukoplakia by real time PCR*

Authors: Saygo Tomo¹, Lígia Lavezo Ferreira¹, Sandra Helena Penha de Oliveira¹, Éder Ricardo Biasoli¹, Kellen Cristine Tjioe¹, Daniel Galera Bernabé¹, Glauco Issamu Miyahara^{1*}

¹Oral Oncology Center, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil.

Keywords:

Leukoplakia; Papillomaviridae; Real-Time Polymerase Chain Reaction.

Correspondence to:

miyahara@foa.unesp.br

*Glauco Issamu Miyahara,

Oral Oncology Center, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba. José Bonifácio Street, 1193, Araçatuba, São Paulo, 16015-050, Brazil.

*Formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Oral Pathology & Medicine (ISSN: 1600-0714) (Anexo C).

Introduction

High-risk human papillomavirus (HPV) detection has been strongly correlated to head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), especially of the oropharynx¹. However, the prevalence and the role of this virus in oral malignant and potentially malignant lesions remain source of debate.

Oral leukoplakia (OL) is the most frequent oral potentially malignant lesion (OPML)² and is described as "a white plaque or stain that cannot be characterized clinically or pathologically as any other disease"^{2,3}. Thus, the diagnosis of OL is established only after excluding other pathological conditions that present as white plaques². OL malignant transformation rates may vary as from 0.13% to 34%⁴ highlighting the importance of studying the factors involved on the appearance and progression of this lesion⁴.

Tobacco smoking is still regarded as the main risk factor for the occurrence of OL⁵. Indeed, OL is the most frequent oral lesion in tobacco users⁶. Other risk factors implicated on the onset of OL are alcohol drinking and biological agents, chiefly fungi and virus². On the other hand, a significant number of cases of OL are not associated to the classic risk factors. Bisht⁷ et al. found that only 46.67% of OL patients were smokers. Liu⁸ et al. reported that 66.5% of the patients with OL had never smoked and that 88.5% of them had never ingested alcoholic beverage, alerting to a possible association of some cases of OL with other etiological factors than tobacco smoking and alcohol drinking.

HPV is a strictly double-stranded epitheliotropic DNA virus⁹. More than 200 HPV subtypes have been described and categorized as low and high-risk HPVs, depending on its potential to lead the epithelium to carcinogenesis⁹. HPV

is the most important etiological agent for cervical cancer⁹ and its role on the occurrence of HNSCC has been widely investigated^{10,11}. For oropharyngeal cancer, HPV-16 and 18 are already shown to be associated with its onset¹¹. On the other hand, the role of HPV on the pathogenesis of other oral lesions is still a mystery. The HPV-16 is the most prevalent high-risk subtype found in HNSCC¹. Nevertheless, conflicting data report a range between 0 and 100% of HPV positive (HPV+) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cases, demonstrating a need for the definition of the role of this virus on oral cancer¹²

In the last years, the interest for detecting HPV in samples of OPML has increased. Syrjänen¹³ et al. performed a systematic review of 956 cases of OPML from cross-sectional studies and found a significant association between OL and HPV infection, supporting the hypothesis of HPV as an etiologic factor for OL. However, there are only few studies investigating the presence of HPV exclusively in OL and the results obtained are quite variable¹³. Either the tissue or the material analyzed, the method used to detect HPV, the criteria for sample selection, and the geographic variation of HPV incidence may influence on the detection rates. Therefore, the aim of this study was to evaluate the prevalence of HPV-16 DNA detection in fresh tissue, saliva and blood plasma from patients with OL by real time PCR in the northwest region of the São Paulo state, Brazil.

Acknowledgments

Saygo Tomo is a recipient of a master's fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no potential conflict of interest regarding this work.

Founding

This work was founded by the Grant: 2016/12982-0 São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

1. Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, Kreimer AR, Hayes RB, Freedman ND, Burk RD. Associations of Oral α -, β -, and γ -Human Papillomavirus Types with Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(5):1-8.
2. Warnakulasuriya S, Johnson N, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-580.
3. Pindborg JJ. International histological classification of tumors / World Health Organization. 2nd ed. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Milan; Barcelona; Budapest; Santa Clara; Singapore: Springer, 1997.
4. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med.* 2016;(45):155-166.
5. Goel A, Goel P, Mishra S, Saha R, Torwane NA. Risk factor analysis for oral precancer among slum dwellers in Delhi, India. *Ann Med Health Sci Res.* 2014;4(3):218-222.
6. Aljabab MA, Aljabab AA, Patil SR. Evaluation of Oral Changes Among Tobacco Users of Aljof Province, Saudi Arabia. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(5):58-61.
7. Bisht RS, Singh AK, Sikarwar V, Darbari A. Study over the clinical picture and histopathology of leukoplakia and to establish the correlation between causative factors in the patients of Garhwal hill region. *Natl J Maxillofac Surg.* 2013;4(2):177-180.

8. Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer*. 2010;10(1):1-6.
9. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer* 2017; 27. doi: 10.1002/cncr.30588. [Epub ahead of print]
10. Moore KA, Mehta V. The growing epidemic of HPV-positive oropharyngeal carcinoma: A clinical review for primary care providers. *J Am Board Fam Med*. 2015;28(4):498-503.
11. Lewis A, Kang R, Levine A, Maghami E. The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Oncology (Williston Park)* 2015; 29(9):616-26.
12. Chen XJ, Sun K, Jiang WW. Absence of high-risk HPV 16 and 18 in Chinese patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Virology* 2016; 20;13:81.
13. Syrjänen, S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral dis*. 2011;17(1):58-72.
14. Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN, Couch ME, Rosenman JG. Never smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. *Head Neck*. 2010;32(4):499-503.
15. D'Souza G, Cullen K, Bowie J, Thorpe R, Fakhry C. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One* 2014; 9: 19–21.

16. 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 carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(1):55-62.
17. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoi E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000;13(6):644–53.
18. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 2011; 40: 489-502.
19. Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, Olshan AF, Wisniewski K, et al. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer* 2017; 1;140(9):1968-1975.
20. Fejerskov O, Roed-Petersen B, Pindborg JJ. Clinical, histological and ultrastructural features of a possibly virus - induced oral leukoplakia. *APMIS*. 1977;85(6):897-906.
21. Koyama K, Uobe K, Tanaka A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(1):18-24.
22. Khovidhunkit PS, Buajeeb W, Sanguansin S, Poomsawat S, Weerapradist W. Detection of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma, leukoplakia and lichen planus in Thai patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9:771-775.

23. Llamas-Martinez S, Esparza-Gomez G, Campo-Trapero J, Cancela-Rodriguez P, Bascones-Martinez A, Moreno-López LA, García-Núñez JA, Cerero-Lapiedra R. Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer Res.* 2008;28(6A):3733-3741.
24. Khanna R, Rao GRK, Tiwary SK, Rai A, Khanna S, Khanna AK. Detection of human papilloma virus 16 and 18 DNA sequences by southern blot hybridization in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Indian J Surg.* 2009;71(2):69-72.
25. Yang SW, Lee YS, Chen TA, Wu CJ, Tsai CN. Human papillomavirus in oral leukoplakia is no prognostic indicator of malignant transformation. *Cancer Epidemiol.* 2009;33(2):118-122.
26. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth ED, et al. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Mol Oral Microbiol.* 2009;24(4):314-318.
27. Mathew A, Mody R, Patait M, Razooki A, Varghese N, Saraf K. Prevalence and relationship of human papilloma virus type 16 and type 18 with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia in fresh scrappings: A PCR study. *Indian J Med Sci.* 2011;65(5):212-221.
28. Baig S, Lucky MH, Qamar A, Ahmad F, Khan S, Ahmed W, et al. Human papilloma virus and oral lesions in gutka eating subjects in Karachi. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2012;22(3):135-138.

29. Kristoffersen AK, Enersen M, Kverndokk E, Sunde PT, Landin M, Solheim T, et al. Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. *J Clin Virol.* 2012;53(4):364-366.
30. Prakash P, Khandare M, Kumar M, Khanna R, Singh GP, Nath G, Gulati AK. Immunohistochemical detection of p16INK4a in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *JCDR.* 2013;7(12):2793-2795.
31. Sikka S, Sikka P. Association of Human Papilloma Virus 16 Infection and p53 Polymorphism among Tobacco using Oral Leukoplakia Patients: A Clinicopathologic and Genotypic Study. *Int J Prev Med.* 2014;5(4):430-438.
32. Pierangeli A, Cannella F, Scagnolari C, Gentile M, Sciandra I, Antonelli G, Ciolfi C, Russo C, Palaia G, Romeo U, Polimeni A. Frequent detection of high human papillomavirus DNA loads in oral potentially malignant disorders. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):95.e9-95.e15.
33. Saghravarian N, Ghazi N, Meshkat Z, Mohtasham N. Human papillomavirus in oral leukoplakia, verrucous carcinoma, squamous cell carcinoma, and normal mucous membrane. *Oman Med J.* 2015;30(6):455-460.
34. Bhargava A, Shakeel M, Srivastava AN, Raza TS, Rizvi S, Varshney P. Role of human papilloma virus in oral leukoplakia. *Indian J Cancer.* 2016;53(1):206-209.
35. Ramya AS, Majumdar S, Babu TM, Uppala D, Srinivas B, Rao AK. Expression of human papillomavirus dna and p53 polymorphisms through polymerase chain reaction in normal mucosa and oral leukoplakia individuals with deleterious oral habits. *Int J App Basic Med Res.* 2017;7(2):134-138.

36. Bhosale PG, Pandey M, Desai RS, Patil A, Kane S, Prabhash K, Mahimkar MB. Low prevalence of transcriptionally active human papilloma virus in Indian patients with HNSCC and leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(5):609-618.
37. Ferreira LL, Biasoli ÉR, Bernabé DG, Nunes CM, Miyahara GI. Plasma HPV DNA is detectable in oral leukoplakia patients. *Pathol Res Pract.* 2017;213(7):759-765.
38. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, Masarik M. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol.* 2014;50(3):168-177.
39. Westra WH. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncol.* 2014;50(9):771-779.
40. Ahn SM, Chan JY, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, Westra W, Koch WM, Califano JA. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction–based detection and surveillance of human papillomavirus–related head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(9):846-854.
41. Goot-Heah K, Kwai-Lin T, Froemming GRA, Abraham MT, Rosdy NMMNM, Zain RB. Human papilloma virus 18 detection in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant lesions using saliva samples. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13(12):6109-6113.
42. Piña AR, Jimenez LS, Mariano FV, de Andrade BA, Carlos R, Altemani A, de Almeida OP. Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016;121(4):412-8.

43. Betiol JC, Sichero L, Costa HO, de Matos LL, Andreoli MA, Ferreira S, et al. Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16(INK4a) expression in head and neck squamous cells carcinomas in São Paulo, Brazil. *Infect Agent Cancer* 2016;4(11):20.
44. Petito G, Carneiro MA, Santos SH, Silva AM, Alencar RC, Gontijo AP, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol* 2017;83(1):38-44.
45. 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;104(3):336–44.
46. Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Willberg J, Grenman S, Syrjänen S. Smoking increases oral HPV persistence among men: 7-year follow-up study. *Eur J of Clin microbiol infect dis*. 2014;33(1):123-133.
47. Haukioja A, Asunta M, Söderling E, Syrjänen S. Persistent oral human papillomavirus infection is associated with smoking and elevated salivary immunoglobulin G concentration. *J Clin Virol*. 2014;61(1):101-106.
48. Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld MLMM, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(10):593-598.
49. Soares GR, Demathé A, Mattar NJ, Biasoli ÉR, Miyahara GI. Absence of HPV infection is associated with smoker patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *J Oncol* 2014.
50. Reed SG, Wahlquist AE. Adults With Oral High-risk Human Papillomavirus (HPV) and/or Smoking History Have a Higher Risk for Clinically Diagnosed

Oral Premalignant Lesions. *J Evidence Based Dent Pract.* 2015;15(3):134-136.

Anexo A

Gráficos dos ensaios de presença e ausência para DNA do HPV-16 pela
Real-Time PCR

Presence/Absence Results

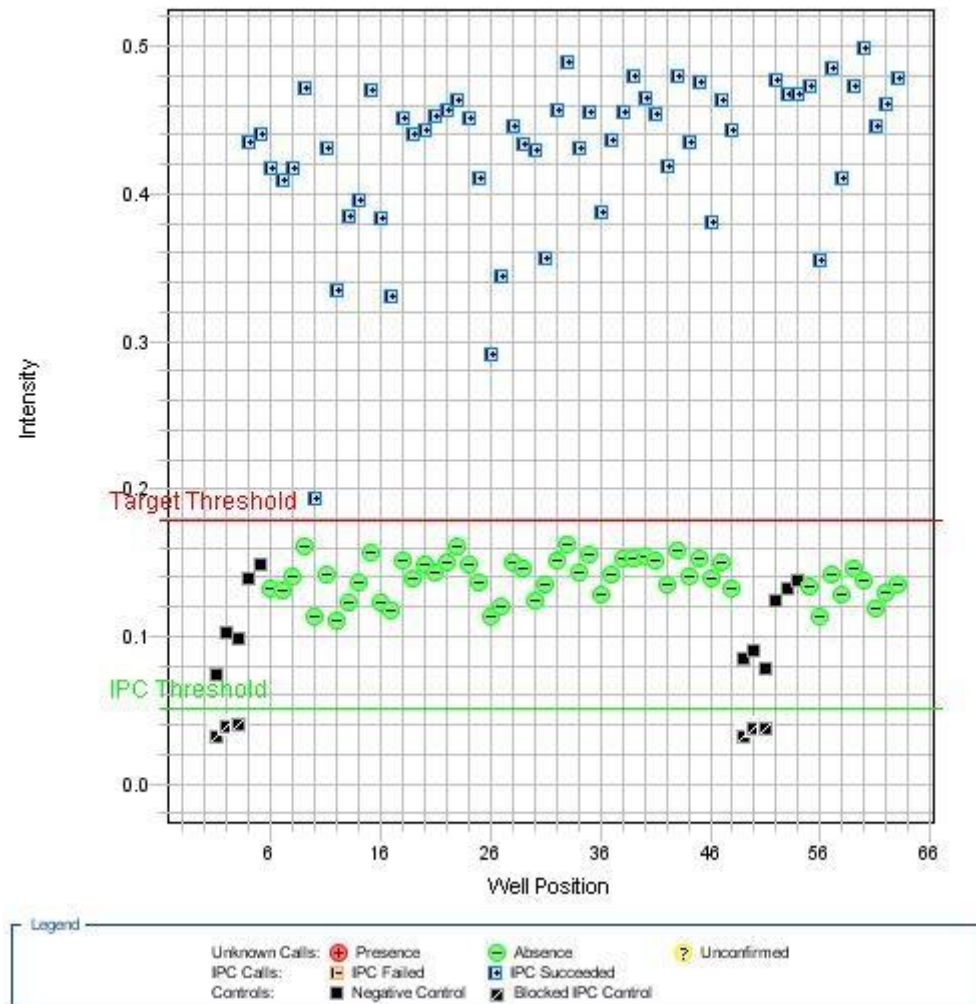


Figure 1. Qualitative real-time PCR results for HPV-16 detection in fresh tissue and saliva samples from patients with OL evidencing samples with absence of viral DNA (green), the positive internal control (IPC) for each reaction (blue) and the three types of negative control (black).

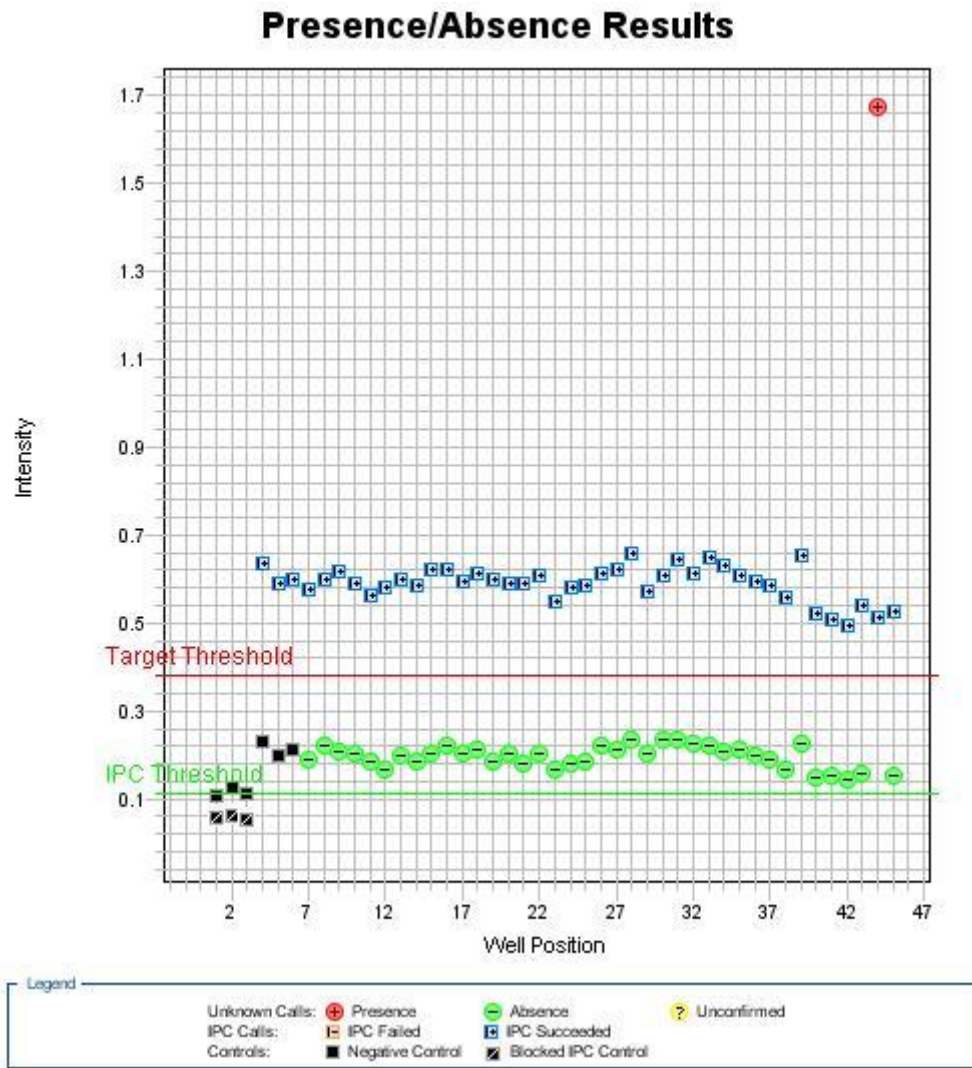


Figure 2. Qualitative real-time PCR results for HPV-16 detection in blood plasma samples from patients with OL evidencing the SiHa cell line sample, used as a positive control (red), samples with absence of viral DNA (green), the positive internal control (IPC) for each reaction (blue) and the three types of negative control (black).

Anexo B

Parecer consubstanciado do CEP – FOA/UNESP



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Deteção do HPV por nPCR em leucoplasias bucais: Estudo caso-controle*", sob a responsabilidade do Pesquisador GLAUCO ISSAMU MIYAHARA, está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 27/05/2011, de acordo com o Processo FOA-01034/2011.

Aracatuba, 06 de junho de 2011.



ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA
Vice-Coordenadora do CEP

ANEXO

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
R. José Bonifácio, 1193 CEP 16015-000 Aracatuba - SP
Tel (18) 3636-3294 E-mail: cep@foa.unesp.br

Anexo C

Periódico de interesse para submissão

Journal of Oral Pathology & Medicine

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Peter Brennan

Impact Factor: 2.043

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 26/90 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 35/79 (Pathology)

Online ISSN: 1600-0714

Qualis CAPES: A2.