

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo  
desta dissertação será  
disponibilizado somente a  
partir de 12/08/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EVALUATION OF p16<sup>Ink4a</sup> EXPRESSION AND PRESENCE OF  
HPV-16 DNA BY REAL TIME PCR IN PATIENTS WITH ORAL  
LEUKOPLAKIA**

**Araçatuba - SP  
2019**

**STEPHANYE PINTO BISS**

**EVALUATION OF p16<sup>Ink4a</sup> EXPRESSION AND PRESENCE OF HPV-16 DNA  
BY REAL TIME PCR IN PATIENTS WITH ORAL LEUKOPLAKIA**

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

**Orientadora: Professora Doutora Kellen Cristine Tjioe**  
**Coorientador: Professor Titular Glauco Issamu Miyahara**

**Araçatuba- SP**

**2019**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B623e | <p>Biss, Stephanye Pinto.<br/>Evaluation of p16Ink4a expression and presence of HPV-16 DNA by <i>Real time</i> PCR in patients with oral leukoplakia / Stephanye Pinto Biss. – Araçatuba, 2019<br/>46 f. : il. ; 2 tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba<br/>Orientadora: Profa. Kellen Cristine Tjioe<br/>Coorientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara</p> <p>1. Imunohistoquímica 2. Leucoplasia 3. Papillomaviridae<br/>4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real I. Título</p> <p>Black D6<br/>CDD 617.63</p> |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## *Dedicatória*

Dedico a conquista e a vitória deste momento...

À minha maravilhosa mãe, **Noeli**, que me deu à luz da vida e me dá forças todos os dias para aguentar as dificuldades encontradas pelo caminho. Uma pessoa que não mede esforços pra me ver bem, e mesmo estando tão longe de mim, sempre foi muito presente. Você é a minha inspiração de força, perseverança e amor incondicional. Eu espero poder retribuir todo esse amor e zelo que você tem por mim. Obrigada por ser essa mãezona maravilhosa, incrível e guerreira, literalmente uma ‘super’ mãe. Em meus momentos de fraqueza você sempre segurou a barra e com sábias palavras me dizia: “Filha, vai ficar tudo bem, mamãe tá aqui pra você”. Você é tudo e mais um pouco pra mim! Agradeço todos os dias por sua existência! Te amo!!!

Ao meu pai, **Adilson**, que mesmo a distância que existe entre nós, você sempre se faz presente na minha vida. E desejo do fundo do meu coração muita paz e amor! Te amo!!

À minha tia-irmã, **Nelcili**, que faz o papel de tia legal e irmã chata. Já passamos por tantas coisas, desde você aumentando o som do rádio pra me assustar quando criança, pintar meu cabelo (oi?) e ser minha parceira nas baladas e na vida. Uma pessoa livre, aberta a conhecer coisas novas e que me ensinou muita coisa, mesmo à distância. Sempre disponível e podendo me ajudar no que fosse possível. Infelizmente você não estará presente fisicamente, mas sei que estará torcendo pela minha vitória. Acho que eu não poderia ter escolhido uma tia tão sensacional como você. E pode ter certeza que muitas coisas que eu sou hoje, você tem uma grande parcela de contribuição nesse meu crescimento. Te amo Shei!!!

Aos meus avós maternos, **Erci e Neuza**, que até hoje eu os chamo de 'pai e mãe'.

Obrigada por todo auxílio na minha educação, vocês foram essenciais. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Daniele e Felipe**, eu só tenho a agradecer à Deus por vocês estarem na minha vida. Não poderia ter pedido irmãos mais legais e loucos iguais a vocês, muita luz e sucesso e que nós estejamos juntos para sempre! Também gostaria de agradecer aos meus cunhados, **Ricardo e Daniele**, por estarem presentes na minha vida, os melhores cunhados que eu poderia ter. E não posso esquecer dos meus queridos sobrinhos, **Rafaela e Alexandre**, um dos melhores presentes que eu poderia ter tido na vida é ser tia. Amo vocês!

À todas as paixões da minha vida, **Piti, Polaco, Rabisco, Melo, Miau, Mário e o Vida**.



## *Agradecimentos especiais*

À **Deus**, que sem a vontade Dele eu nem estaria aqui neste momento. Ele que me preparou pra eu estar aqui e sem Ele, eu não teria conseguido vencer essa etapa. Obrigada meu Deus por ter sido tão bom comigo e ter me guiado e encontrado pessoas especiais que me ajudaram a percorrer esse caminho tão árduo. Quando eu achava que não tinha saída, Você vinha e mostrava o que eu não enxergava, e me guiou até eu vencer e mostrando que nunca, nada, é impossível aos olhos do Senhor.

À minha orientadora, **Prof. Dra. Kellen Cristine Tjioe**, que eu não tenho palavras por tudo que a senhora fez por mim. Acabei caindo de paraquedas na sua orientação e foi uma das melhores coisas que poderia ter me ocorrido no mestrado. Mesmo com todos os seus afazeres do pós doutorado e pra ajudar, estando fora do país, a senhora sempre foi disponível com qualquer coisa que eu precisasse. Gostaria de ter aproveitado mais a nossa convivência. Obrigada pelos ensinamentos e pelas palavras sábias, levo a senhora no meu coração. Obrigada!

Ao meu coorientador, **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, que foi o motivo inicial de eu querer estar no mestrado na FOA/UNESP. Gostaria de agradecer por todas as palavras, os ensinamentos e a disponibilidade, mesmo o senhor sempre com tantos compromissos. Obrigada por ter permitido que eu tivesse a oportunidade de estar na sua equipe, aprendendo sobre a Estomatologia e fazer parte do Centro de Oncologia Bucal, do qual, era um dos meus sonhos. Obrigada!

Ao **Prof. Ass. Daniel Galera Bernabé**, que é um professor de um brilhantismo e uma dedicação à pesquisa e a docência imensurável. Me espelho em um dia tornar uma professora com uma paixão tão grande pelo o que faz e acredita. Obrigada por todos os momentos bons compartilhados.

Ao **Prof. Adj. Éder Ricardo Biasoli**, que é um cirurgião excepcional de extrema competência, de um convívio leve e harmonioso.

Ao **Prof. Adj. Marcelo Macedo Crivelini**, que me ajudou na realização e análise da imunohistoquímica. Obrigada pelos ensinamentos e por toda a disponibilidade.

À **Prof. Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira**, agradeço por toda a disposição da utilização do laboratório, sem isso, não conseguiria ter desenvolvido minha pesquisa. Meus agradecimentos.

À minha primeira orientadora e idealizadora do meu sonho, **Prof. Dra. Estela Maris Losso**, que me introduziu na área da pesquisa e mostrou um mundo totalmente alheio aos meus conhecimentos. Sempre com muita paciência, me ensinou os desafios da pesquisa e suas recompensas também. Onde eu estou hoje, é resultado da sua dedicação por mim. Obrigada eternamente!

## *Agradecimentos*

À minha amiga, **Glúvia Queiroz Lima**, que foi a minha parceira nesses dois anos de mestrado. Obrigada por todos os momentos vividos, as festas, as brigas, os choros, as conquistas, tudo! Tenho certeza que Deus colocou você no meu caminho pra me segurar quando eu não conseguia ficar mais em pé, para me aconselhar e comemorar as vitórias. Também agradeço por ter sido acolhida pela Família **Queiroz Lima**. Você é uma pessoa iluminada e que ilumina todos ao redor, e hoje já nem consigo imaginar se você não tivesse presente na minha vida. Te desejo muita luz e sucesso, porque você é sensacional. Infelizmente nossa jornada juntas termina por aqui, mas com certeza nos reencontraremos muito ainda. Te amo incondicionalmente!

À minha amiga e colega de mestrado, **Giseli Mitsuy Kayahara**, eu não tenho palavras pra te agradecer por tudo, tudo mesmo. É uma profissional excepcional e uma amiga incrível. Acredito que as vezes eu te deixava meio louca (e eu sei que você vai sentir falta, já te disse), mas você com a sua calma nipônica, me colocava nos eixos e tudo dava certo. Sempre com a maior paciência do mundo pra me ajudar, me ensinar. Meu mestrado ficou muito mais leve quando começamos a conviver e sou muito agradecida por isso. Sentirei falta das nossas conversas e da nossa convivência. Você é maravilhosa Gi! Te desejo muito sucesso!

À minha amiga, **Daniela Brito Bastos**, obrigada por sua amizade, mesmo que tardia, deu match. Obrigada por toda sua dedicação, amizade, paciência e os momentos juntas. Uma amiga que não mede esforços para ver os outros bem e felizes. Também gostaria de agradecer ao **Leandro** por todos os momentos vividos. Foi maravilhoso ter sido sua

amiga, você é uma pessoa incrível, que me ensinou muita coisa e com certeza você estará comigo sempre. Te desejo muito sucesso! Te amo.

Aos meus queridos vizinhos, **Neusa e Eurides Montibeller**, obrigada por toda a amizade e carinho. Sentirei muita falta de vocês e também do Dick. Só tenho a agradecer por uma amizade tão pura, fazendo eu me sentir em casa, e isso é muito bom. Obrigada!

Aos meus amigos de graduação, **Kaíke Lessa e Nádia Militão**, que estão presentes na minha vida sempre e que eu os amo muito. Que a nossa amizade perdure os anos e que estejamos sempre ‘presentes’ nos momentos mais importantes das nossas vidas. Obrigada pela amizade, e por sempre estarem comigo quando eu precisei. Muita luz e sucesso a nós todos!

Ao meu psicólogo, **Rafael Baptista**, que sem você não sei como teria sido aguentar essa barra que se chama ‘pós-graduação’ e ‘estar longe de casa’ ao mesmo tempo. A sua presença foi imprescindível para o meu amadurecimento, compreensão e luta dos meus sonhos e objetivos. Obrigada eternamente!

À minha amiga, **Raiane Perez**, a melhor manicure do mundo. Obrigada por esses anos de amizade e estar sempre presente na minha vida. Só tenho a agradecer a nossa amizade ser tão sólida. Estarei sempre aqui para o que precisar. Muito sucesso! Te amo.

À minha amiga, **Luana Trevelin de Carvalho**, pela nossa amizade especial e por um dos maiores presentes que eu já recebi: o **Vida**. Sem você, a minha casa não teria tanta alegria como tem hoje. Muito sucesso ‘dotôra’. Te amo.

À minha amiga, **Beatriz Alves Furtado**, pela nossa amizade especial, pelas caronas e por todos os favores. Você é uma amiga muito especial, sentirei saudades. Te amo.

Às minhas meninas, **Mariana Vieira de Souza e Fernanda Antunes**, por me darem uma ‘palhinha’ de como é ser uma orientadora. Vocês me ensinaram que o caminho é árduo, mas não tem nada melhor como o gosto da vitória e da conquista. Sou muito agradecida de vocês terem entrado na minha vida. Sucesso princesas!

Aos amigos da Pós-Graduação (**Saygo Tomo, Jéssica Figueira, Vitor Valente, Bruna Sarafim, Tamara Fernandes de Castro**), agradeço por toda amizade e experiências compartilhadas no dia-a-dia. Cada um com sua personalidade, com seu método de trabalho e maneira de enxergar a vida, contribuiu para meu crescimento pessoal, profissional, além de trabalho em equipe. Sou privilegiada em ter tido pessoas tão maravilhosas ao meu lado durante esse percurso.

Ao departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, e aos docentes **Prof. Cristiane Furuse, Prof. Ana Maria Soubhia, Prof. Renata Calestini**, por toda a paciência, conhecimento e tempo dedicado. À querida **Adriana Leal**, que tanto me ajudou em todos os momentos que precisei. Sentirei muito sua falta. Obrigada por todos os conselhos, uma mãezona mesmo. E a funcionária **Marli Santos**, por todos os cafés quentinhos e acolhedores. Obrigada.

Aos Funcionários do Centro de Oncologia Bucal – COB (**Anne Cocato, Jane Fátima, Gabrielle Duarte, Daniene Ribeiro, Regiane Nogueira, Francisco Collado, Sebastião Conrado**). Gostaria de agradecer pela convivência durante essa caminhada, por sempre

estarem dispostos em me ajudar, por terem feito meus dias mais agradáveis. Agradeço por termos criado, além de um convívio profissional, termos construído laços de uma amizade tão sincera. Obrigada por terem contribuído, cada um à sua maneira, para minha formação.

À equipe do laboratório de farmacologia, **Beatriz Ballassoni, Ayná Barreto, Victor Balera e Sabrina Frasnelli**, por toda ajuda no laboratório e na realização dos experimentos.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do Diretor **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** e o Vice-Diretor, **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho**, pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso de Mestrado. Agradeço pelo empenho e dedicação para o crescimento não só da faculdade, mas também da pós-graduação em Odontologia da FOA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual coordenador **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Valéria Zagato, Lilian Mada e Cristiane Lui**, pela disponibilidade e gentileza em ajudar.

**Aos pacientes**, meu muito obrigada! A vocês que foram essenciais à minha formação. Vocês serão sempre razão e estímulo ao meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado durante meus dois anos de mestrado. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro durante a minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio regular concedido à nossa equipe (Processo no. 2016/12982-0) e por todo suporte financeiro indispensável para a realização deste estudo.

## *Epígrafe*

“Sempre há outra chance, uma outra amizade, um outro amor. Para todo fim, um recomeço.”

Antoine de Saint-Exupéry

Biss SP. Avaliação da expressão da p16<sup>Ink4a</sup> e a presença do DNA do HPV-16 pela *Real time* PCR em pacientes com leucoplasia bucal. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

### Resumo

**Objetivo:** Avaliar a expressão do p16<sup>Ink4a</sup> por imunohistoquímica e a presença do HPV-16 pela *Real time* PCR em tecido fresco, plasma e saliva de pacientes com leucoplasia bucal (LB) e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI). **Material e métodos:** Foram incluídos 67 pacientes com o diagnóstico de LB e 44 pacientes com diagnóstico de HFI no estudo. Foram coletados dados sociodemográficos, clinicopatológicos, amostras de tecido fresco, sangue e saliva, que foram armazenados em um freezer a -80°C para realização de análise molecular. Também foi utilizado o tecido parafinizado para realização da imunohistoquímica para a p16<sup>Ink4a</sup>. As amostras de materiais biológicos obtidos dos pacientes foram submetidas à detecção do DNA do HPV-16 pela *Real time* PCR. O tecido parafinizado dos mesmos pacientes foram utilizados para avaliar a expressão da p16<sup>Ink4a</sup> pela imunohistoquímica. **Resultados:** Dos 67 pacientes incluídos de LB no estudo, 55,2% eram do sexo masculino com uma média de idade de 57,1 anos. Os pacientes idosos (>45 anos) compuseram 86,6% da amostra. As localizações anatômicas mais acometidas por LB foram a mucosa jugal (35,8%) e língua (20,9%). Sobre o tabagismo, 71,8% dos pacientes eram fumantes, onde a maioria (47,8%) foi classificada como tabagista leve. Em relação ao consumo de álcool, 47,4% eram alcoolistas, sendo a sua maioria classificada como alcoolista leve (59,3%). O grupo HFI foi composto por 54,5% pacientes do sexo masculino com uma média de idade de 57,3 anos. 90,9% dos pacientes eram idosos (>45 anos). A ocorrência das lesões foram em mucosa jugal (31,8%) e rebordo alveolar (25%). A expressão para p16<sup>Ink4a</sup> na LB foi fraca (41,8%) e para o grupo HFI, majoritariamente a expressão foi forte (68,2%). *Real time* PCR não detectou HPV-16 em nenhuma das amostras analisadas. **Conclusão:** Os achados em nosso estudo mostraram que a detecção de HPV de alto risco em tecido fresco, plasma e saliva para LB e HFI não se correlacionaram com a superexpressão da p16<sup>Ink4a</sup>.

**Palavras-chave:** Imunohistoquímica, Leucoplasia, Papillomaviridae, Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Biss SP. Evaluation of p16<sup>Ink4a</sup> expression and presence of HPV-16 DNA by *Real time* PCR in patients with oral leukoplakia. [dissertation] – Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2019.

### Abstract

**Objective:** To evaluate the expression of p16<sup>Ink4a</sup> by immunohistochemistry and the presence of HPV-16 by *Real time* PCR in fresh tissue, blood plasma, and saliva of patients with oral leukoplakia (OL) and inflammatory fibrous hyperplasia (IFH). **Material and methods:** Sixty-seven patients with the diagnosis of OL and 44 patients with the diagnosis of IFH were included in the study. Sociodemographic, clinicopathological, fresh tissue, blood, and saliva samples were collected and stored at - 80°C for molecular analysis. Paraffinized-embedded tissue was also used to perform the immunohistochemistry for p16<sup>Ink4a</sup>. Samples of biological material obtained from the patients were submitted to HPV-16 DNA detection by real time PCR, both with specific probes. Paraffinized-embedded tissue from the same patients were used to evaluate the expression of p16<sup>Ink4a</sup> by immunohistochemistry. **Results:** Out of the 67 included OL patients, 55.2% were male with a mean age of 57.1 years. Elderly patients (> 45 years) comprised 86.6% of the sample. The prevalence of lesions was highest in the buccal mucosa (35.8%) followed by the mobile tongue (20.9%). 71.8% were smokers and the majority (47.8%) was classified as light smoker. Regarding alcohol consumption, 47.4% were alcoholics, most of whom were classified as light alcoholics (59.3%). The IFH group was composed of 54.5% of male patients with a mean age of 57.3 years. 90.9% of the sample were elderly patients (> 45 years). The highest occurrence of the lesions was in buccal mucosa (31.8%) and alveolar ridge (25%). The expression for p16<sup>Ink4a</sup> in LB was mostly weak (41.8%) and for the IFH group, the expression was mostly strong (68.2%). There was no positivity in any of the samples for HPV-16 by real time PCR. **Conclusion:** Our findings showed the HR-HPV detection in fresh tissue, plasma blood and saliva for OL and IFH does not correlate with p16<sup>Ink4a</sup> immunoexpression in paraffinized-embedded tissue.

**Keywords:** Immunohistochemistry, Leukoplakia, Papillomaviridae, Real-time polymerase chain reaction.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                           |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> | Oral leukoplakia A. absent, with B. mild, C. moderate, and D. severe epithelial dysplasia, (H&E, 200x) .....                              | 19 |
| <b>Figure 2.</b> | Inflammatory fibrous hyperplasia presenting A. absent, B. mild, C. moderate, and D. intense inflammatory infiltrate (H&E, 200X).....      | 19 |
| <b>Figure 3.</b> | Oral leukoplakia presenting A. absent, B. weak, and C. strong immunostaining for p16 <sup>Ink4a</sup> , (IHC, 200X) .....                 | 20 |
| <b>Figure 4.</b> | Inflammatory fibrous hyperplasia presenting A. absent, B. weak, and C. strong immunostaining for p16 <sup>Ink4a</sup> , (IHC, 200X) ..... | 20 |
| <b>Figure 5.</b> | Correlation between epithelial dysplasia and p16 <sup>Ink4a</sup> expression.                                                             | 21 |
| <b>Figure 6.</b> | Correlation between the inflammatory infiltrate intensity and p16 <sup>Ink4a</sup> expression in inflammatory fibrous hyperplasia .....   | 21 |
| <b>Figure 7.</b> | Correlation between the p16 <sup>Ink4a</sup> expression in oral leukoplakia and inflammatory fibrous hyperplasia.....                     | 22 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                                         |    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> | Sociodemographic, clinicopathologic and lifestyle data, p16 <sup>Ink4a</sup> and HPV-16 DNA detection results of patients with OL.....  | 17 |
| <b>Table 2.</b> | Sociodemographic, clinicopathologic and lifestyle data, p16 <sup>Ink4a</sup> and HPV-16 DNA detection results of patients with IFH..... | 18 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|              |   |                                                        |
|--------------|---|--------------------------------------------------------|
| <b>DNA</b>   | = | Deoxyribonucleic acid                                  |
| <b>EDTA</b>  | = | Ethylenediamine tetraacetic acid                       |
| <b>FFPE</b>  | = | Formalin-fixed, paraffin-embedded                      |
| <b>HPV</b>   | = | Human Papillomavirus                                   |
| <b>HNSCC</b> | = | Head and neck squamous cell carcinoma                  |
| <b>IFH</b>   | = | Inflammatory fibrous hyperplasia                       |
| <b>IHQ</b>   | = | Immunohistochemistry                                   |
| <b>IPC</b>   | = | Internal positive control                              |
| <b>ISH</b>   | = | <i>in situ</i> hybridization                           |
| <b>nPCR</b>  | = | Nested polymerase chain reaction                       |
| <b>OPMD</b>  | = | Oral potentially malignant disorders                   |
| <b>OL</b>    | = | Oral leukoplakia                                       |
| <b>OSCC</b>  | = | Oral squamous cell carcinoma                           |
| <b>pRb</b>   | = | Retinoblastoma protein                                 |
| <b>qPCR</b>  | = | Quantitative polymerase chain reaction                 |
| <b>SCC</b>   | = | Squamous cell carcinoma                                |
| <b>UNESP</b> | = | Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho |

## SUMÁRIO

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Introduction          | 11 |
| Materials and Methods | 13 |
| Results               | 16 |
| Discussion            | 23 |
| References            | 27 |
| Anexo A               | 32 |
| Anexo B               | 33 |
| Anexo C               | 34 |

**Evaluation of p16<sup>Ink4a</sup> expression and presence of HPV-16 DNA by *Real time* PCR in patients with oral leukoplakia\***

**Authors:** Stephanye Pinto Biss<sup>1</sup>, Saygo Tomo<sup>1</sup>, Sandra Helena Penha de Oliveira<sup>2</sup>, Marcelo Macedo Crivelini<sup>3</sup>, Éder Ricardo Biasoli<sup>1</sup>, Daniel Galera Bernabé<sup>1</sup>, Kellen Cristine Tjioe<sup>1</sup>, Glauco Issamu Miyahara<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Basic Science, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Pathology and Clinical Propaedeutic, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

**Keywords:** Immunohistochemistry, Leukoplakia, Papillomaviridae, Real-time polymerase chain reaction.

**Correspondence to:**

Glauco Issamu Miyahara  
Oral Oncology Center  
São Paulo State University (UNESP), Araçatuba School of Dentistry  
Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, São Paulo, Brazil 16015-050  
glauco.miyahara@unesp.br

**\*Formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Oral Pathology and Medicine (ISSN: 1600-0714)**

## INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) has been classically associated with the development of cervical cancer (1) and, more recently, with the onset of tumors arising in other mucosal sites (2). In oropharyngeal cancer, HPV has been demonstrated as a risk factor for its occurrence while in oral cancer this relationship remains unclear (3). HPV has an exclusively intraepithelial infectious cycle and infects both mucosal squamous epithelium and cutaneous squamous epithelium (4). Currently, over than 200 subtypes of HPV have been identified and they are grouped as high-risk (HR) and low-risk (LR) according to their oncogenic potential (5). HPV subtypes 16 and 18 are the most common HR subtypes (6-8). The association between HR-HPV and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is well established, mostly in oropharyngeal cancer (9, 10). Additionally, HPV+HNSCC seems to have better prognosis than HPV– HNSCC (11).

Oral leukoplakia is the most frequent oral potentially malignant disorder (OPMD) (12). The most affected sites by leukoplakia are the lateral tongue border and floor of the mouth (13). Leukoplakia has been observed mostly in middle-aged men, with an increasing prevalence in increasing age (14). The classic risk factors for development of OL are alcohol and tobacco (15). Interestingly, recent studies have been suggesting HPV as a possible risk factor for OL (16). HPV has been detected in samples of OL in variable indices. Saghravanian *et al.* (17) evaluated 20 samples of fresh tissue OL and in none of the samples HPV was found. On the other hand, we previously found HPV-16 detection in 68.75% of OL fresh tissue (22/32) (18). However, a recent study reported no association between OPMD and HPV (2). This reinforces the need of studies to aiming at establishing the relationship between OPMD and HPV.

## REFERENCES

1. Mahmoodi P, Fani M, Rezayi M, Avan A, Pasdar Z, Karimi E, et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *Biofactors*. 2019;45(2):101-17.
2. 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. *Virol J*. 2016;13:81.
3. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015;6(3):244-8.
4. Flanagan CE, Rhodus NL, Cole KA, Szabo E, Ondrey FG. Correlation analysis of oral lesion sizes by various standardized criteria. *Am J Otolaryngol*. 2016;37(6):502-6.
5. So KA, Hong JH, Lee JK. Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution Among 968 Women in South Korea. *J Cancer Prev*. 2016;21(2):104-9.
6. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J*. 2011;8:269.
7. Rantshabeng P, Kasvosve I, Ndlovu A, Gaseitsiwe S, Moyo S. Prevalence of high-risk human papilloma virus in women with high-grade squamous cell intraepithelial lesions in Botswana using Abbott RealTime HPV assay. *PLoS One*. 2019;14(1):e0211260.
8. Xu HH, Wang K, Feng XJ, Dong SS, Lin A, Zheng LZ, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and relative risk of cervical cancer in China: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(20):15386-97.
9. LeConte BA, Szaniszlo P, Fennewald SM, Lou DI, Qiu S, Chen NW, et al. Differences in the viral genome between HPV-positive cervical and oropharyngeal cancer. *PLoS One*. 2018;13(8):e0203403.
10. Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, et al. Associations of Oral  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(5):599-606.
11. Dok R, Nuyts S. HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2016;8(4).

12. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-80.
13. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(4):723-34.
14. Bewley AF, Farwell DG. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol.* 2017;35(5):461-7.
15. Porter S, Gueiros LA, Leão JC, Fedele S. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(6):603-11.
16. Panneerselvam K, Rameshkumar A, Rajkumar K, Ramadoss R. Detection of human papillomavirus 16 and 18 in patients with oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral disorders in South Indian population: A pilot study. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(3):571-5.
17. Saghravanian 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):455-60.
18. Ferreira LL, Biasoli É, Bernabé DG, Nunes CM, Miyahara GI. Plasma HPV DNA is detectable in oral leukoplakia patients. *Pathol Res Pract.* 2017;213(7):759-65.
19. Duncan LD, Winkler M, Carlson ER, Heidel RE, Kang E, Webb D. p16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1367-75.
20. Awan MS, Irfan B, Zahid I, Mirza Y, Ali SA. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry Assays for Analysing Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(6):XC10-XC3.
21. 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.
22. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92(2):276-84.
23. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(3):155-66.

24. Sundberg J, Korytowska M, Burgos PM, Blomgren J, Blomstrand L, DE Lara S, et al. Combined Testing of p16 Tumour-suppressor Protein and Human Papillomavirus in Patients With Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2019;39(3):1293-300.
25. Pierangeli A, Cannella F, Scagnolari C, Gentile M, Sciandra I, Antonelli G, et al. Frequent detection of high human papillomavirus DNA loads in oral potentially malignant disorders. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):95.e9-.e15.
26. 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):206-9.
27. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(6):612-27.
28. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol (Rome).* 2017;10(3):209-20.
29. Mahajan A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. *Hum Pathol.* 2016;51:64-74.
30. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307(7):693-703.
31. Bhosale PG, Pandey M, Desai RS, Patil A, Kane S, Prabhash K, et al. 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):609-18.e7.
32. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999;18(38):5311-7.
33. Ayhan S, Isisag A, Saruc M, Nese N, Demir MA, Kucukmetin NT. The role of pRB, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology.* 2010;57(98):251-6.
34. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011;30(18):2087-97.
35. LQ Y, X X, CX L, WY W, XM S, ZT Z, et al. Human papillomavirus genotypes and p16 expression in

- oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2019. p. 1022-8.
36. Kim JH, Choi KY, Lee DJ, Rho YS, Jo SJ. Loss of Heterozygosities in Five Tumor Suppressor Genes (FHIT Gene, p16, pRb, E-Cadherin and p53) in Thyroid Tumors. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2014;7(1):53-8.
  37. Shukla P, Dahiya V, Kataria P, Sabharwal S. Inflammatory hyperplasia: From diagnosis to treatment. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18(1):92-4.
  38. Feller L, Lemmer J. Oral Leukoplakia as It Relates to HPV Infection: A Review. *Int J Dent*. 2012;2012:540561.
  39. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. 2013;2(1):51-61.
  40. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S63-74.
  41. Ahn SM, Chan JY, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. 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):846-54.
  42. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015;7(293):293ra104.
  43. Qureishi A, Ali M, Fraser L, Shah KA, Møller H, Winter S. Saliva testing for human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A diagnostic accuracy study. *Clin Otolaryngol*. 2018;43(1):151-7.
  44. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):291-319.
  45. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J*. 2012;9:262.
  46. Hans R, Marwaha N. Nucleic acid testing-benefits and constraints. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(1):2-3.
  47. Farah CS, Woo SB, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Dent*. 2014;2014:853479.
  48. Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A, et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res*. 2008;28(5A):2535-9.

