

Adriana Demathé

**Detecção de papilomavírus humano (HPV) em material biológico de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe**

ARAÇATUBA  
2011

Adriana Demathé

**Detecção de papilomavírus humano (HPV) em material biológico de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Grau de “Doutor em Odontologia”, Área de concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Co-orientadores: Prof. Dr. José Fernando Garcia

Profa. Dra. Styna Marita Syrjänen

**ARAÇATUBA**  
2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D372c Demathé, Adriana.  
Detecção de papilomavírus humano (HPV) em material biológico de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe/Adriana Demathe. Araçatuba : [s.n.], 2011.

77 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2011

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Coorientador: Prof. Dr. José Fernando Garcia

Coorientadora: Profa. Dra. Styna Marita Syrjänen

1. Carcinoma de células escamosas 2. Papillomaviridae  
3. Reação em cadeia da polimerase

Black D65  
CDD 617.634

# Dados Curriculares

- Nascimento: 19.10.1969 Curitiba – PR
- Filiação : Valdir Demathé e Helenir Demathé
- 1992/1996 : Graduação em Odontologia – Universidade Estadual de Maringá – UEM
- 2000/2001 : Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, nível de Especialização – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP
- 2006/2007 : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Estomatologia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
- 2008/2011 : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Estomatologia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP



# Dedicatória

# Dedicatória

Aos meus familiares: minha querida irmã **Veridiana**, minha sobrinha **Letícia**, minha avó **Ana**, minha prima **Carla** e meus tios **Almir** e **Diva** agradeço pelo carinho, pelas palavras amigas e pelo auxílio que me prestaram durante esta jornada.

À minha grande amiga **Maria de Lurdes Braun** obrigada pela convivência, carinho e pela paciência que teve comigo.

**À Deus**, que me deu forças e persistência para ultrapassar todos os obstáculos encontrados, minha eterna gratidão.



# Agradecimentos Especiais

# Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara**, pela sua paciência, constante incentivo e por não ter me deixado desistir durante o tortuoso caminho que encontrei neste período.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. José Fernando Garcia**, meu obrigada, pelas oportunidades de aprendizado e por incentivar sempre meu espírito investigativo.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Styna Marita Syrjänen**, seus trabalhos foram uma fonte de inspiração, muito obrigada pelo contato e orientações nesta pesquisa.

À **Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes** por seu auxílio em momentos de dificuldades, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Éder Ricardo Biasoli** por ter sempre uma palavra amiga.

À minha grande amiga **Eloisa Gregori** por partilhar comigo as alegrias e tristezas do cotidiano, meus agradecimentos e muitas felicidades nesta nova etapa de sua vida.



**Agradecimentos**

# Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, no nome da atual Diretora **Prof<sup>a</sup>. Adj. Ana Maria Pires Soubhia** e do Vice-Diretor **Prof. Adj. Wilson Roberto Poi**.

Ao **Programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da coordenadora **Profa. Ass. Dr. Maria José Hitomi Nagata**.

Aos **docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Pires Soubhia, Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli, Prof. Dr. Norberto Perri Moraes Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Claudia Okamoto, Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior, Prof. Dr. Gilberto Aparecido Coclete, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda Maria Pescinini Salzedas, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Callestini Felipini, meus agradecimentos pela acolhida.

Às **funcionárias do Centro de Oncologia Bucal** (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva e Nair Ramos Macedo Cardoso pelo auxílio fundamental nos momentos necessários.

Aos **funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Marli Barbosa dos Santos, Miriam Regina Mouro Ferraz Lima, Maria Aparecida Martins da Silva, Elaine Cristina Francischini Ferreira, Luzia Maria de Oliveira

Francischini e José Marcelo Tramarin pelo carinho e dedicação que sempre tratam os alunos.

Aos **amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)** da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Érica de Souza Ribeiro, Valquiria Rissato Gazola, Pedro Luis Florindo, Fulvia di Pillo, Adriana Santana do Carmo, Silvana de Cássia Paulan, Fernanda Muller de Oliveira e Danielly Vieira Bortoletto, pelos momentos de convivência e pelo auxílio técnico.

Ao **Instituto de Patologia de Araçatuba**, por cederem as amostras necessárias para o estudo.

Ao amigo **Daniel Bernabé** pelos momentos compartilhados e troca de conhecimentos durante esta jornada, obrigada.

A **Profa. Dra. Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld** muito obrigada pela atenção e cuidado com que realizou a análise estatística desse trabalho.

Aos **funcionários da Seção de pós-graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Valeria de Queiroz Marcondes Zagatto e Diogo Luis Reatto, pela presteza com que sempre me atenderam.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, Ana Cláudia Martins, Izamar da Silva Freitas, Fernando Fukunishi, Cláudio Maciel Junior, Maria Claudia de Castro Benez, Cláudio Hideo Matsumoto e Marina Alves dos Santos, pela atenção carinho com que sempre atenderam as minhas solicitações.

Aos **colegas pós-graduandos da estomatologia**, muito obrigada pelo convívio e pela troca de experiências.

À **Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** (Processo N° 2010 / 00026-1) agradecimentos pelo auxílio financeiro.

À **Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP** (Processo N° 00467/009) agradecimentos pelo auxílio financeiro.

Demathé A. Detecção de papilomavírus humano (HPV) em material biológico de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

## Resumo

O papilomavirus humano (HPV) tem sido relacionado com a etiologia dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, em análise de tecidos cerca de 60% destes carcinomas podem ser HPV positivos. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença do HPV em material genético obtidos de tecidos, secreção salivar e sangue de pacientes portadores de carcinoma epidermóide (CEC) de orofaringe e controles e a correlação da presença viral com as variáveis sexo, idade, tabagismo, etilismo e perfil anatomopatológico do tumor. Foi realizada uma análise do material genético de 46 pacientes com diagnóstico de CEC de orofaringe e 40 pacientes sem carcinoma. A extração do DNA dos espécimes foi realizada utilizando o kit de extração de DNA QuiAMP. O DNA isolado foi submetido a PCR para beta-globina para confirmar a presença e integridade do DNA, em seguida, foram realizadas novas reações para detecção do DNA do HPV. Para análise estatística foram empregados o teste Qui-quadrado e teste exato de Fisher. A idade média de idade foi de 60 anos para os casos e 58,2 anos para os controles e a mediana foi de 59 e 56 anos, respectivamente. Os resultados obtidos com a metodologia descrita permitiram concluir que não houve diferenças estatisticamente significativas na análise das variáveis em relação à presença do papilomavírus humano nas amostras de tecidos biológicos dos pacientes estudados.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermóide. Papillomaviridae. Reação em cadeia da polimerase.

Demathé A. Human papillomavirus (HPV) detection in biological tissues of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2011.

## Abstract

Human papillomavirus (HPV) it has been related with head and neck SCC etiology, about 60% of these carcinomas tissues can be HPV positive. The aim of this study was to analyze the HPV presence in genetic material obtained from tissues, salivary secretion and blood of oropharyngeal SCC patients and controls and correlate the virus presence with variables: sex, age, smoking, alcoholism and pathological profile of the tumours. It was made molecular and statistical analysis of genetic material of 46 oral and oropharyngeal SCC patients and 40 controls patients without carcinoma. The DNA extraction of all specimens was accomplished using the DNA extraction kit QuiAMP. The isolated DNA was submitted PCR for beta-globin to confirm the DNA presence and integrity, after new reactions it was accomplished for HPV DNA detection. Chi-square test and Fisher exact test were used for statistical analysis. The average age was 60 years for cases and 58.2 years for controls and the median age was 59 and 56 years respectively. The results obtained with the described methodology shows there was no statistically significant differences between HPV presence in samples of biological tissues and the analyzed variables.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma. Papillomaviridae. Polimerase chain reaction.

# Epígrafes

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar,  
É melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver...”

**Martin Luther King**

“Se pude enxergar mais longe foi  
porque estava nos ombros de gigantes...”

**Isaac Newton**

# Lista de Abreviaturas

**HPV** - do inglês Human Papillomavirus

**DNA** - do inglês Deoxyribonucleic Acid

**PCR** - do inglês Polymerase Chain Reaction

**nPCR** - do inglês nested Polymerase Chain Reaction

**HeLa** - linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula

**CP** - Controle Positivo

**NO** - Amostra contendo mistura de componentes e ausência de DNA

**PM** - Peso Molecular

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer

**IARC** - do inglês International Agency for Research on Cancer

**COB** - Centro de Oncologia Bucal

**FOA-UNESP** - Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

**dNTP** - do inglês Deoxyribonucleotide Triphosphate

**pb** - pares de base

**CDC** - do inglês Center of Disease Control

**TNM** - Sistema de Classificação de tumores malignos

**PBS** - do inglês Phosphate Buffered Saline

# Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>18</b>
<b>2 Proposição</b>	<b>22</b>
<b>3 Material e Método</b>	<b>24</b>
<b>4 Resultados</b>	<b>36</b>
<b>5 Discussão</b>	<b>43</b>
<b>6 Conclusões</b>	<b>51</b>
<b>Referências</b>	<b>54</b>
<b>Anexos</b>	<b>62</b>



# Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 15 anos o papilomavírus humano (HPV) foi a principal causa do câncer de colo de útero e sua etiologia atualmente tem sido relacionada com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço,<sup>1</sup> em especial os carcinomas de orofaringe.<sup>2</sup>

O papilomavirus humano é um vírus circular, não envelopado, com aproximadamente 7,9 kD que infecta células escamosas do epitélio. O HPV infecta a camada basal do epitélio através de rupturas na superfície epitelial se mantendo no núcleo das células basais. As infecções por HPV frequentemente se apresentam clinicamente como verrugas ou papilomas. Cerca de 120 subtipos de HPV já foram identificados e eles se dividem em HPV's de alto e baixo risco de acordo com sua propensão a causar neoplasias. Os HPV's de baixo risco estão associados a verrugas benignas enquanto que os subtipos de alto risco estão associados com displasia e carcinomas invasivos.<sup>3</sup> Na cavidade oral os subtipos de baixo risco mais comuns são os HPV's 11, 36 e 42 enquanto que os subtipos de alto risco mais comuns são o HPV 16, 18 e 31.<sup>4</sup>

Cerca de 90% das infecções pelo HPV's associados aos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são causadas pelo HPV16.<sup>1</sup> O HPV, principalmente os tipos 16 e 18, tem um papel direto na carcinogênese codificando oncoproteínas, as quais são capazes de promover a transformação celular por alterar a regulação do ciclo celular, o sistema telomero/telomerase, a apoptose e outros sinalizadores celulares.<sup>2</sup>

A detecção de anticorpos para as proteínas L1, E6 e E7 do HPV realizada em um estudo caso-controle com 1670 pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e 1732 controles demonstrou que a presença destes anticorpos estava associada a um risco três vezes maior para carcinomas orais e nove vezes maiores para carcinomas de orofaringe.<sup>5</sup>

Cerca de 30% dos carcinomas epidermóides de orofaringe podem ser associados com a presença do HPV.<sup>2</sup> Em uma revisão sistemática sobre detecção de HPV de 5.046 biópsias de casos de carcinomas epidermóides (2.642 casos da cavidade oral, 969 casos de orofaringe e 1.435 casos de laringe), a

maior prevalência de HPV positivo foi em carcinomas epidermóides de orofaringe (35.6%), seguida pela laringe (24%) e orais (23.5%).<sup>1</sup>

O DNA do HPV tem sido isolado em materiais biológicos como tecidos parafinados e células exfoliadas da mucosa oral, estas obtidas através de bochechos ou esfregaços.<sup>6</sup>

Em estudo de lesões orais potencialmente malignas e lesões malignas, demonstrou-se que na comparação de detecção do DNA do HPV, este é mais facilmente detectável pela análise de células exfoliadas do que pela análise de espécimes de biópsia, com sensibilidade de 50% e especificidade de 100%, através de Southern Blot.<sup>7</sup>

Testes salivares em pacientes que no pós tratamento se apresentam ainda positivos para HPV podem ser bons marcadores de recorrência do tumor.<sup>4</sup> O papilomavirus humano também tem sido detectado no soro e plasma de pacientes com carcinoma cervical HPV positivos, com taxas que variam de 7 a 48%<sup>8</sup> e também em soro de pacientes HIV/HPV positivos.<sup>9</sup> Na região de cabeça e pescoço o HPV foi detectado em 45,6% dos pacientes portadores de carcinoma através da análise de secreção salivar.<sup>10</sup>

Dados de recentes estudos moleculares e epidemiológicos sugerem fortemente que carcinomas de orofaringe HPV positivos apresentam padrões clínicos, epidemiológicos, patológicos e moleculares distintos provavelmente associados à infecção pelo HPV e que apresentam um melhor prognóstico em relação aos pacientes HPV negativos.<sup>11,12</sup>

Recente revisão sistemática sobre a presença do HPV mostrou uma prevalência de 38,1% em carcinomas orais e 24,1% em carcinomas de cabeça e pescoço. Com relação ao método de detecção os estudos baseados em PCR relatam uma taxa de prevalência maior (34,8% versus 32,9%) em relação à hibridização in situ.<sup>13</sup> Pacientes HPV positivos com tumores tem melhores taxas de respostas após à quimioterapia (84% versus 57%) comparados aos pacientes HPV negativos. Um seguimento de 39,1 meses em pacientes HPV positivos que tiveram câncer mostrou um acréscimo de 33% na sobrevida.<sup>14</sup>

Diante das evidências apresentadas sabemos que os carcinomas epidermóides de orofaringe relacionados ao HPV possuem uma evolução tumoral

distinta e que diferenças no manejo clínico de tumores HPV positivos e negativos representam o melhor argumento para se incrementar o uso da detecção destes vírus.

Há também outras indicações clínicas para este *screening*:

- (1) definir melhor o prognóstico do paciente;
- (2) otimizar a seleção do tratamento;
- (3) educação do paciente.<sup>5</sup>

Devido à importância do tema se torna necessário a proposição de formas de *screening* para detecção do HPV em cavidade oral.



# Proposição

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

1. Analisar a presença do papilomavírus humano (HPV) em tecidos obtidos de biópsias, secreção salivar e sangue de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de orofaringe e de pacientes não portadores de carcinoma de cabeça e pescoço.



# Material e Método

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP), (Processo SISNEP Número: FOA 2008/00869) (Anexo A).

Este estudo baseou-se numa análise prospectiva de 46 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de orofaringe diagnosticados no Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e 40 pacientes sem carcinoma, que se enquadraram nos critérios de seleção do estudo, no período de março de 2007 a fevereiro de 2011.

#### **Critérios de seleção:**

Os critérios para a inclusão dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe foram:

1. Pacientes portadores de carcinoma epidermoide de orofaringe com registro no Centro de Oncologia Bucal (Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP) e confirmação diagnóstica através de exame histológico;
2. Pacientes tratados com finalidade curativa.

Os critérios para inclusão dos controles foram:

1. Pacientes que necessitavam de procedimento cirúrgico oral (cunha distal ou cirurgia pré-protética);
2. Pacientes tratados com finalidade curativa.

3. Pacientes que possuíam os mesmos fatores de risco para o carcinoma (etilismo e tabagismo) e pacientes sem nenhum destes vícios.
4. Pacientes com mais de 40 anos de idade.
5. Pacientes sem histórico de carcinoma de cabeça e pescoço.

**Coleta de dados:**

Através de formulário próprio foram coletadas informações existentes nos prontuários dos pacientes. Os dados utilizados para avaliação das possíveis associações entre as variáveis foram obtidos dos prontuários e transcritos para uma ficha clínica individual (Anexo B).

Foram considerados tabagistas os indivíduos que fumaram diariamente durante alguma época da vida, mesmo aqueles que abandonaram o vício. Os não-tabagistas foram aqueles que não fizeram uso do fumo diariamente. Foram considerados etilistas aqueles que consumiam no mínimo um drink por dia e não etilistas os que não utilizavam álcool diariamente.<sup>15</sup>

Foi realizada a classificação TNM e o grupamento por estádios de acordo com as recomendações preconizadas pela União Internacional Contra o Câncer (Anexo C).<sup>16</sup> O diagnóstico histopatológico das peças cirúrgicas foi revisado por um único patologista, utilizando para a graduação histológica a classificação de Broders<sup>17</sup> (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado).

**Coleta de materiais biológicos:**

Depois de selecionados os pacientes portadores de carcinoma de boca e orofaringe que preenchiam os critérios de elegibilidade foram coletados materiais biológicos para realização dos procedimentos laboratoriais.

Para os pacientes com suspeita de carcinoma:

1. Foram solicitados exames pré-operatórios considerados necessários para cada caso. Na coleta de sangue foi separado 1 ml para sorologia do HPV.
2. Foram realizadas biópsias ou exéreses de lesões e o material obtido foi dividido em duas partes, uma parte seguiu para processamento histopatológico de rotina e outra parte foi congelada para posterior exame biomolecular de detecção do HPV. Não houve necessidade de se aumentar a amplitude do procedimento cirúrgico visto que somente 25 miligramas de material são suficientes para detecção do DNA. A remoção do fragmento bucal para análise molecular foi realizada de forma a não interferir na análise microscópica das margens cirúrgicas.
3. Foram realizados swabs da lesão, nos pacientes com carcinoma de orofaringe e swabs da região de orofaringe, bilateralmente, nos pacientes controle para comparações com a sorologia e material obtido de peças operatórias. Certificou-se anteriormente que a pessoa submetida à coleta da amostra que o paciente estava em jejum há pelo menos 30 minutos. Procedeu-se à coleta das amostras esfregando-se o swab firmemente contra cada mucosa 6 vezes. O swab foi conservado em um tubo eppendorf de 2 ml contendo 300 microlitros de PBS. Solicitou-se que o paciente eliminasse saliva em um copo descartável durante um minuto e o material obtido foi conservado em tubos eppendorf de 2 ml. Estes dois

materiais (swab e saliva) foram misturados em laboratório para compor a secreção salivar que então foi analisada molecularmente.

Para os pacientes do grupo controle:

1. Foram selecionados 40 pacientes sem carcinoma que necessitavam de cirurgias orais por outras causas (ver observação).
2. Foram solicitados exames pré-operatórios considerados necessários para cada caso. Na coleta de sangue foi separado 1 ml para sorologia do HPV.
3. Foram realizados swabs da região de orofaringe para comparações com o material obtido da cirurgia. Solicitou-se que o paciente eliminasse saliva em um copo descartável durante um minuto e o material obtido foi conservado em tubos eppendorf de 2 ml. Estes dois materiais (swab e saliva) foram misturados em laboratório para compor a secreção salivar que então foi analisada molecularmente.

**Observação:** os procedimentos cirúrgicos (cunha distal ou cirurgia pré-protética) foram realizados independentemente da pesquisa, pois se configuram como tratamento.

### ***Extração de DNA de tecido parafinado***

Devido à impossibilidade de obtenção de material congelado de todos os pacientes optou-se pela padronização de extração de DNA de tecido parafinado.

Foram coletados de seis a dez cortes histológicos com 08 micrômetros das peças parafinadas até obter 25 mg de material, procedendo-se a descontaminação do micrótomo com xilol e troca de luvas e lâminas entre cada exemplar. Após a coleta, os cortes foram identificados, acondicionados em tubos de polipropileno esterilizados de 1,5 ml e mantidos em temperatura ambiente até o momento da extração.

Para a realização da extração do DNA, foram seguidos três passos: desparafinização, digestão e purificação.

A desparafinização foi realizada pela dissolução da parafina em xilol e etanol, revertendo a embebição e desidratação dos tecidos processados. Aos tubos foram adicionados 1200 µl de xilol (Synth®) e agitados por 15 segundos em vortex (Thermoline® – EUA). Em seguida os tubos foram centrifugados (Centrifuge 5417C – Eppendorf®– Alemanha) a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e sobre o sedimento foram adicionados 1200 µl de álcool etílico absoluto (Synth®) no tubo. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos e centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante. Este ciclo (xilol-etanol) foi repetido novamente e ao final do processo as tampas foram abertas e os tubos colocados em um bloco térmico (Dri-block DB3 – Techne® - Inglaterra) a 37°C por 15 minutos para evaporação do etanol remanescente.

A digestão dos tecidos foi feita adicionando-se ao tubo 20 µl de solução contendo proteinase K (20mg/ml) e 180 µl de ATL (tissue lysis buffer) do kit de extração de DNA (QIAamp DNA Mini Kit® – QIAGEN Ltd, Crawley, UK),

agitando-se no vortex por 1 minuto e mantendo-se o material em banho-maria (Modelo 146 – FANEM – São Paulo – Brasil) por 3 horas, a 56°C.

Para o isolamento dos ácidos nucléicos foi utilizado o sistema de extração de DNA QIAamp DNA Mini Kit®, segundo as instruções do fabricante e o DNA extraído (100 µl) foi transferido para tubos de polipropileno com tampa rosqueável, identificado e conservado a – 20° C. Após esta etapa, a quantidade e pureza do DNA genômico foram determinadas através da espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

Com a confirmação da presença e integridade do DNA, foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene controle da β-globina. Em caso de ausência do gene da β-globina foi realizada nova extração de DNA pelo método do fenol-clorofórmio.

### **Extração de DNA de sangue**

Foram colocados 200 µl de cada amostra de sangue dentro de um tubo eppendorf de 1,5 ml identificados, foram adicionados 20 µl de proteinase K às amostras e os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos. Adicionou-se 200 µl de buffer AL e agitaram-se os tubos em vórtex por 15 segundos, levando-os em seguida ao banho-maria a 56° C por 10 minutos. Após a incubação o material foi retirado do banho-maria e os tubos foram colocados na centrífuga a 8000 rpm, por 10 segundos, para retirar as bolhas.

Adicionou-se 200 µl de etanol 100% aos tubos e agitaram-se os tubos em vórtex por 15 segundos. Em seguida os tubos foram colocados na centrífuga a 8000 rpm por 10 segundos, seu conteúdo foi transferido para a porção superior dos tubos com coluna do kit QIAamp e foram centrifugados a 8000

rpm por 1 minuto. Desprezou-se o filtrado trocando-se o tubo inferior e acrescentou-se 500 µl do Buffer AW1 centrifugando-se o tubo a 8000 rpm por 1 minuto. Após a etapa anterior foram acrescentados 500 µl do Buffer AW2 e os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 3 minutos. Para etapa final acrescentou-se 100 µl de AE para ressuspender/diluir o DNA, o tubo foi deixado em repouso por 1 minuto, centrifugando-o em seguida a 8000 rpm por 1 minuto. O DNA obtido foi armazenado à -20° C até a espectrofotometria e PCR.

### ***Extração de DNA de secreção salivar***

O tubo contendo as células exfoliadas foi colocado em vórtex por 30 segundos e então foram retirados 400 µl da amostra sendo misturado com 400 µl da amostra de saliva do mesmo paciente, em um novo tubo antes de se proceder a extração de DNA.

Adicionou-se 400 µl de PBS, 400 µl de AL e 20µl de proteinase K ao tubo contendo a secreção salivar e agitou-se em vórtex por 15 segundos. A incubação da amostra foi feita à 56° C por 10 minutos.

Após a incubação adicionou-se 400µl de etanol 100% à amostra e misturou-se novamente no vórtex por 15 segundos, centrifugando-o em seguida por 10 segundos a 8000 rpm. Do volume total de 1220 µl, foram aplicados 600µl da mistura anterior à coluna do tubo de centrifugação do kit QIAmp e centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto. O filtrado resultante foi desprezado e foi aplicado o restante da mistura repetindo-se a centrifugação.

Após descarte do restante do filtrado foram adicionados 500µl da solução AW1 e os tubos foram centrifugados à velocidade de 8000 rpm por 1

minuto. Colocar a parte superior do tubo com a coluna sobre um tubo de coleta de 2ml limpo e descartar o tubo contendo o filtrado. Adicionar 500 $\mu$ l da solução AW2 e centrifugar à velocidade máxima (14000 rpm) por 3 minutos. Descartado o filtrado anterior foram adicionados 100  $\mu$ l da solução AE, incubados à temperatura ambiente por 1 minuto e depois centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Este DNA obtido foi mantido à temperatura de 20°C até a utilização.

O DNA obtido de ambos os materiais foi submetido à espectrofotometria através de software próprio (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE) para confirmação da presença e integridade do DNA, posteriormente foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene controle da  $\beta$ -globina humana e para o gene do HPV.

### ***PCR para gene humano controle***

Foram realizadas as PCR para o gene controle da  $\beta$ -globina (110 pares de base) utilizando os oligonucleotídeos PCO3 (5'-ACACAAGTGTGTTCACTAGC-3') e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3') descritos por Nonogaki et al.<sup>18</sup> A reação foi realizada em termociclador (Peltier Effect Cycling modelo PTC – 100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, USA) adicionando-se ao DNA um mix com os seguintes componentes: 10,9  $\mu$ l de água ultra-pura; 1,5  $\mu$ l (15 pmol) de cada oligonucleotídeo iniciador (PCO3 e PCO4); 0,1  $\mu$ l (1U) de Taq DNA polimerase 2,5  $\mu$ l de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl); 2,0  $\mu$ l (4 mM) de MgCl<sub>2</sub>; 1,5  $\mu$ l (0,25 mM) de dNTPs

(deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), com exceção da água ultra-pura e dos dNTPs, os demais componentes são da Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

Após a mistura dos componentes em um fluxo - laminar (Heto-Holter Tivo HV PCR, Dinamarca) foram adicionados 5 µl do DNA de cada amostra totalizando um volume final de 25 µl. Como controle positivo (CP) para o gene da β-globina foi utilizada uma amostra de sangue previamente testada e como controle negativo (NO) uma amostra contendo somente o mix, sem DNA.

Os fragmentos de DNA foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, com extensão final a 72° C por 8 minutos.

Para verificação da presença do DNA humano foi feita a análise através da eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão 1x TBE (Fonte Eletroforética - Amersham Pharmacia Biotech modelo EP3501, Suécia), durante 1 hora a 100 volts. A visualização foi feita após coloração com brometo de etídeo observado o gel sob luz ultravioleta. A documentação foi realizada com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Após a confirmação da presença e integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do gene do HPV através de dois métodos: PCR e nPCR com oligonucleotídeos iniciadores para o DNA do HPV. Para as amostras com resultado negativo para o DNA da β-globina foram realizadas novas extrações de DNA dos materiais genéticos e repetida a PCR. As amostras que continuaram negativas após o segundo teste foram descartadas.

### ***PCR para amplificação do HPV***

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta técnica foram MY11 (5'-GCMCAGGGWCTATAAYAATGG-3') e MY09 (5'-CTCCMARRGGAWACTGATC-3') da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, para amplificar fragmentos da região tardia L1 do genoma viral, com 450 pares de bases.<sup>19</sup>

Os componentes do mix para esta PCR foram: 10,9 µl de água ultra-pura; 2,5 µl de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl); 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (4 mM); 1,5 µl de dNTPs (0,25 mM); 0,2 µl (2U) de Taq polimerase e 1,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (15 pmol). Em fluxo laminar foi adicionado 5 µl de DNA genômico de cada amostra. Como controle positivo para infecção por HPV, foi utilizada uma amostra de HeLa, uma linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultra-pura.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 40 segundos, com extensão final a 72° C por 4 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 3 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

### ***nPCR para amplificação do HPV***

Na primeira etapa da nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos MY09 e MY11, com os componentes do mix e condições de termociclagem citadas acima. Após a termociclagem foram separados 2 µl do produto obtido nesta primeira PCR para utilização na segunda etapa da nPCR.

Na segunda etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3') e GP6+ (5'-GAAAAATAAACTTGTAATCATATTC-3') da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, cujo fragmento é de 150 pares de bases.<sup>20</sup> A mistura de amplificação, os controles utilizados e as condições de ciclagem foram semelhantes às da primeira etapa, com diferenças na quantidade de água ultra-pura (13,9 µl) e na temperatura de anelamento (43°C). Os produtos da nPCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida sob as mesmas condições da técnica de PCR e após evidênciação foi realizada a documentação. Estes processos (PCR e nPCR) foram feitos em duplicata cada material (sangue, secreção salivar e biópsia), quando houve divergência entre os dois resultados o processo foi feito em triplicata.

Foi verificada a existência de associação entre as variáveis dos dois grupos estudados pela aplicação de testes estatísticos (Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher) com nível de significância de 5%.



# Resultados

## 4 RESULTADOS

Todas as amostras analisadas, dos pacientes portadores de carcinoma de orofaringe e controles, amplificaram o gene controle da  $\beta$ -globina humana e conseqüentemente foram utilizadas para análise da presença do DNA do HPV através da aplicação dos métodos de PCR em duas etapas. Os resultados numéricos estão expressos nas tabelas 1 a 6 e parte dos resultados laboratoriais está ilustrada nas figuras 1 e 2 abaixo.

**Tabela 1 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em sangue com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe**

Variáveis	Pacientes (n=46)		Sangue				
	n	%	HPV+		HPV-		p*
<b>Sexo</b>							
Masculino	37	(80)	24	(65)	13	(35)	
Feminino	09	(20)	05	(56)	04	(44)	
<b>Idade</b>							0,595
<60	29	(63)	16	(55)	13	(45)	
>=60	17	(37)	08	(47)	09	(52)	
<b>Estadiamento</b>							0,320
I	07	(15)	04	(57)	03	(43)	
II	07	(15)	05	(71)	02	(29)	
III	10	(22)	09	(90)	01	(10)	
IV	22	(48)	11	(50)	11	(50)	
<b>Gradação histológica</b>							0,375
Bem diferenciado	09	(20)	04	(44)	05	(56)	
Moderadamente	29	(63)	21	(72)	08	(28)	
Pouco diferenciado	08	(17)	04	(50)	04	(50)	
<b>Tabaco</b>							0,389
Tabagista	40	(87)	26	(65)	14	(35)	
Não tabagista	06	(13)	03	(50)	03	(50)	
<b>Alcool</b>							0,182
Etilista	37	(80)	25	(68)	12	(32)	
Abstêmio	09	(20)	04	(44)	05	(56)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	03		02	(67)	01	(33)	0,695

**Tabela 2 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em secreção salivar com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe**

Variáveis	Pacientes (n=46)		Secreção salivar				p*
	n	%	HPV+		HPV-		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Sexo</b>							0,432
Masculino	37	(80)	28	(76)	09	(24)	
Feminino	09	(20)	06	(67)	03	(33)	
<b>Idade</b>							0,242
<60	24	(52)	16	(67)	08	(33)	
>=60	22	(48)	18	(82)	04	(18)	
<b>Estadiamento</b>							0,316
I	07	(15)	05	(72)	02	(28)	
II	07	(15)	06	(86)	01	(14)	
III	10	(22)	07	(70)	03	(30)	
IV	22	(48)	16	(73)	06	(27)	
<b>Gradação histológica</b>							0,745
Bem diferenciado	09	(20)	07	(78)	02	(22)	
Moderadamente	29	(63)	20	(69)	09	(31)	
Pouco diferenciado	08	(17)	07	(87)	01	(13)	
<b>Tabaco</b>							0,500
Tabagista	40	(87)	29	(73)	11	(27)	
Não tabagista	06	(13)	05	(83)	01	(17)	
<b>Álcool</b>							0,568
Etilista	37	(80)	27	(73)	10	(27)	
Abstêmio	09	(20)	07	(78)	02	(22)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	03		02	(67)	01	(33)	0,606

**Tabela 3 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em tecido com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe**

Variáveis	Pacientes (n=46)		Tecido				
	n	%	HPV+		HPV-		p*
			n	%	n	%	
<b>Sexo</b>							<b>0,013</b>
Masculino	37	(80)	16	(43)	21	(57)	
Feminino	09	(20)	00	(00)	09	(100)	
<b>Idade</b>							0,306
<60	24	(52)	10	(42)	14	(58)	
>=60	22	(48)	06	(27)	16	(73)	
<b>Estadiamento</b>							0,293
I	07	(15)	02	(29)	05	(71)	
II	07	(15)	02	(29)	05	(71)	
III	10	(22)	02	(20)	08	(80)	
IV	22	(48)	10	(45)	12	(55)	
<b>Gradação histológica</b>							0,135
Bem diferenciado	09	(20)	01	(11)	08	(89)	
Moderadamente	29	(63)	10	(34)	19	(66)	
Pouco diferenciado	08	(17)	05	(63)	03	(37)	
<b>Tabaco</b>							0,307
Tabagista	40	(87)	15	(38)	25	(62)	
Não tabagista	06	(13)	01	(17)	05	(83)	
<b>Álcool</b>							0,098
Etilista	37	(80)	15	(41)	22	(59)	
Abstêmio	09	(20)	01	(11)	08	(89)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	03		00	(0)	03	(100)	0,267

**Tabela 4 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em sangue com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes sem carcinoma epidermóide**

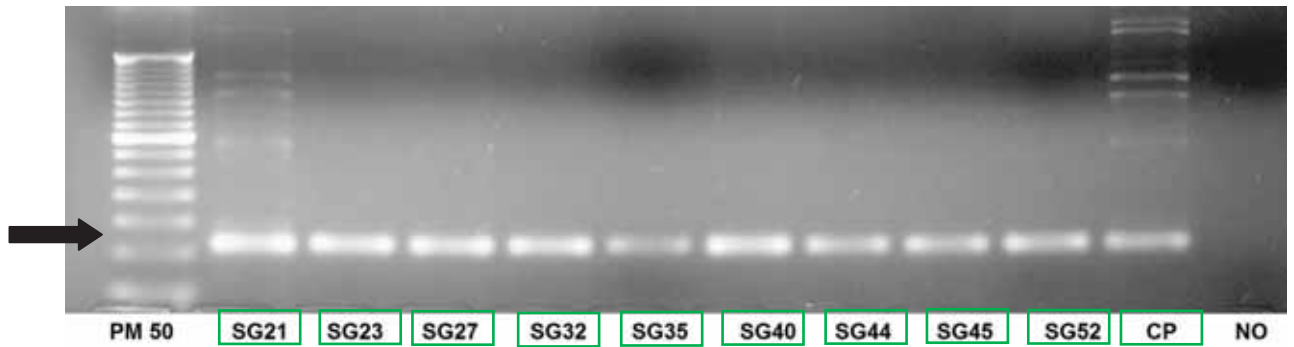
Variáveis	Pacientes (n=40)		Sangue				
	n	%	HPV+		HPV-		p*
			n	%	n	%	
<b>Sexo</b>							0,111
Masculino	26	(65)	16	(57)	10	(83)	
Feminino	14	(35)	12	(43)	02	(17)	
<b>Idade</b>							0,677
<60	22	(55)	16	(57)	06	(50)	
>=60	18	(45)	12	(43)	06	(50)	
<b>Tabaco</b>							0,072
Tabagista	09	(22)	04	(14)	05	(42)	
Não tabagista	31	(78)	24	(86)	07	(58)	
<b>Álcool</b>							0,071
Etilista	12	(30)	06	(21)	06	(50)	
Abstêmio	28	(70)	22	(79)	06	(50)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	22		18	(82)	04	(18)	0,071

**Tabela 5 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em secreção salivar com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes sem carcinoma epidermóide**

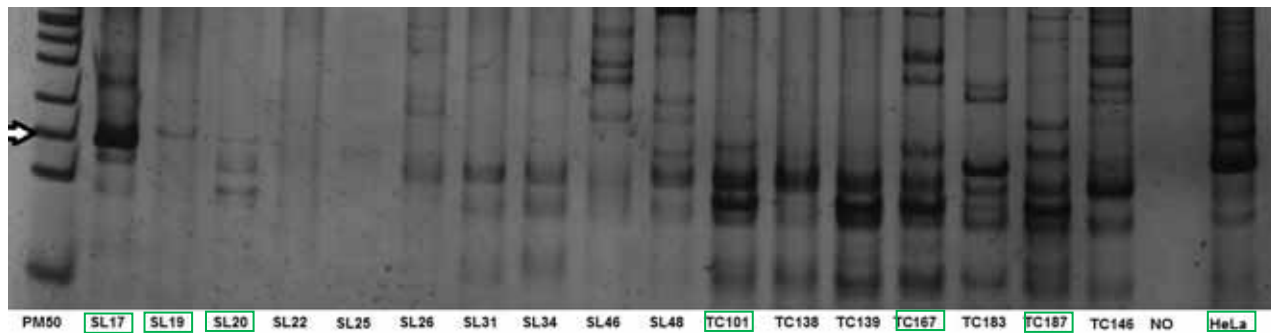
Variáveis	Pacientes (n=40)		Secreção salivar				
	n	%	HPV+		HPV-		p*
<b>Sexo</b>							
Masculino	26	(65)	13	(59)	13	(72)	
Feminino	14	(35)	09	(41)	05	(28)	
<b>Idade</b>							0,482
<60	22	(55)	11	(50)	11	(61)	
>=60	18	(45)	11	(50)	07	(39)	
<b>Tabaco</b>							0,970
Tabagista	09	(22)	05	(23)	04	(22)	
Não tabagista	31	(78)	17	(78)	14	(78)	
<b>Alcool</b>							0,677
Etilista	12	(30)	06	(27)	06	(33)	
Abstêmio	28	(70)	16	(73)	12	(67)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	22		16	(73)	06	(27)	<b>0,013</b>

**Tabela 6 - Correlação entre a presença do DNA do HPV detectado em tecido com as variáveis clínico patológicas e os fatores de risco dos pacientes sem carcinoma epidermóide**

Variáveis	Pacientes (n=40)		Tecido				
	n	%	HPV+		HPV-		p*
<b>Sexo</b>							
Masculino	26	(65)	05	(56)	21	(68)	
Feminino	14	(35)	04	(44)	10	(32)	
<b>Idade</b>							0,970
<60	22	(55)	05	(56)	17	(55)	
>=60	18	(45)	04	(44)	14	(45)	
<b>Tabaco</b>							0,667
Tabagista	09	(22)	02	(22)	07	(23)	
Não tabagista	31	(78)	07	(78)	24	(77)	
<b>Alcool</b>							0,552
Etilista	12	(30)	03	(33)	09	(29)	
Abstêmio	28	(70)	06	(67)	22	(71)	
<b>Fatores de risco desconhecidos</b>	22		06	(27)	16	(73)	0,424



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da betaglobina humana (110 pb) por PCR em parte das 46 amostras de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe. PM 50 = peso molecular de 50 pb; SG = sangue; CP = controle positivo para betaglobina; NO = controle negativo



**Figura 2** – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (140 pb) por nPCR em parte das 46 amostras de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe. PM 50 = peso molecular de 50 pb; SL = secreção salivar; TC = tecido; NO = controle negativo; HeLa = controle positivo para HPV

A idade média de idade foi de 60 anos para os pacientes portadores de carcinoma de orofaringe e 58,2 anos para os controles e a mediana foi de 59 e 56 anos, respectivamente. Tanto o cruzamento entre as médias de idades dos grupos quanto o cruzamento entre as faixas etárias (idade acima ou abaixo de 60 anos) não foram estatisticamente significativos.

Os cruzamentos entre os grupos HPV negativo e HPV positivo tanto entre os pacientes portadores de carcinoma de orofaringe como entre os controles não foram estatisticamente significativos segundo as variáveis: idade, tabagismo, etilismo, grau histológico e estadiamento clínico.

A análise de tecido dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe mostrou que 100% dos casos em mulheres foram HPV negativos enquanto que para os homens esta porcentagem foi de apenas 57% ( $p=0,013$ ) conforme demonstra a tabela 3.

Na análise de secreção salivar dos pacientes sem carcinoma e sem os hábitos de etilismo e tabagismo a diferença entre os casos HPV positivos e negativos foi significativa ( $p=0,013$ ) mostrando que 73% dos pacientes sem hábitos eram HPV positivos conforme tabela 5.

Apesar das amostras positivas terem sido submetidas a um seqüenciador automático (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems - Amersham Biosciences) não foi possível a tipagem dos HPVs encontrados neste estudo, possivelmente devido ao pequeno tamanho do fragmento dos primers utilizados na segunda etapa da PCR (140 pb).



# Discussão

## 5 DISCUSSÃO

Os trabalhos encontrados na literatura apresentam taxas variáveis de detecção do DNA do HPV principalmente devido aos diferentes tipos de material biológico estudado (esfregaços, sangue, saliva, tecido congelado, tecido parafinado), localização anatômica, questões populacionais, técnicas/meios de detecção do vírus, desenho dos oligonucleotídeos e número de amostras estudadas.<sup>21</sup>

Quanto à análise dos diversos tipos de materiais biológicos, SahebJamee et al.,<sup>22</sup> detectaram uma positividade para o DNA do HPV de 40,9% nos pacientes com carcinoma oral e de 25% em pacientes não portadores de carcinoma oral através da análise de saliva. Em nosso estudo a presença de DNA do HPV na secreção salivar (a secreção salivar compôs-se da mistura da saliva com células exfoliadas) foi de 73,9% para os pacientes portadores de carcinoma epidermóide de orofaringe(34/46) e 55% para os controles. Através da análise de células exfoliadas também já foi demonstrado que mesmo os tecidos normais adjacentes a lesões apresentam positividade diferente para o DNA do HPV (41,2% versus 35,3%).<sup>23</sup>

Similarmente a outras investigações que utilizaram saliva<sup>7,10,24</sup>, nosso estudo não encontrou correlação entre a presença do DNA do HPV em saliva e o carcinoma epidermóide de orofaringe. Em contraste, em estudo de Zhao et al.<sup>10</sup>, foi demonstrado que a presença do DNA do HPV 16 na saliva pode refletir o status do HPV 16 em carcinomas de cabeça e pescoço e sugeriram que a análise quantitativa do HPV 16 na saliva tem uma especificidade de 99% porém

com alta taxa de falso-positivos. Discordamos de Zhao et al.<sup>10</sup> e Smith et al.<sup>25</sup> que acreditam que a detecção de DNA do HPV na saliva/células exfoliadas pode ser um fator preditivo para o surgimento de carcinomas de cabeça e pescoço relacionados ao HPV, pois deve-se levar em conta a persistência da infecção com HPVs de alto risco, fator diretamente dependente do sistema imune e hábitos do hospedeiro (número de parceiros sexuais, sexo sem proteção, tabagismo, etilismo entre outros). Estudos com pacientes imunologicamente comprometidos (HIV positivos) tem mostrado maiores taxas de detecção de DNA do HPV na saliva.<sup>26</sup> Acreditamos entretanto que a persistência da infecção associada a lesões pré-malignas como a leucoplasia deveria ser melhor estudada.

Quanto às células exfoliadas concordamos com Herrero et al.<sup>27</sup>, que não encontrou associação entre a positividade para o DNA do HPV e os carcinomas de cabeça e pescoço e discordamos de Smith et al.<sup>25</sup> que demonstraram uma associação estatística entre a detecção de HPVs de alto risco em células exfoliadas e tecidos tumorais sugerindo que o *screening* para HPV usando células exfoliadas pode ser preditivo para carcinomas de cabeça e pescoço relacionados ao HPV. Vale lembrar que a análise da saliva e células transitórias pode indicar apenas uma contaminação e não necessariamente uma infecção, enquanto que a análise do tecido representa uma infecção instalada.<sup>28</sup> Tal fato ficou comprovado na análise da secreção salivar de pacientes sem hábitos cuja diferença entre os casos HPV positivos e HPV negativos foi significativa ( $p=0,013$ ), mostrando um maior número de pacientes HPV positivos entre os controles sem hábitos de etilismo e tabagismo.

Na análise de sangue Capone et al.<sup>28</sup>, encontraram uma taxa de positividade para DNA do HPV de 17% através da PCR, dot blot, hibridização, southern blot, hibridização e hibridização in situ e utilizando os primers MY09/MY11. Já Tachezy et al.<sup>29</sup>, num estudo caso-controle detectaram anticorpos do HPV no sangue de 44% dos casos e 4% dos controles e concluíram que nem sempre a presença do DNA do HPV no sangue resulta em soroconversão. Em estudos com pacientes saudáveis, doadores de sangue, Chen et al.<sup>30</sup> encontraram positividade para o DNA do HPV em 8,3 % dos participantes e sugeriram que o sangue pode representar um meio de reserva e um novo meio de transmissão viral. Analisando sangue através da nPCR encontramos 63 % nos pacientes portadores de carcinoma de orofaringe e 70 % nos controles do presente estudo. Concordamos com os autores que acreditam que este seja um possível meio de disseminação do vírus através do organismo<sup>28,30</sup>. Entre as regiões acometidas pelo câncer de cabeça e pescoço, a orofaringe tem sido a localização com maior prevalência de HPV sendo especificamente a tonsila o local mais acometido pelo vírus<sup>1,31,32</sup>. A distinção entre as áreas da cavidade bucal, orofaringe e laringe é necessária já que a distribuição do vírus é diferente nos diversos sítios anatômicos<sup>21,25,33-35</sup> sendo em orofaringe 2,6 vezes maior que na boca<sup>36</sup>. Na análise de tecido dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de orofaringe avaliados encontramos uma positividade de 34,8%. Em recente metanálise esta taxa variou entre 3,35% e 84%, sendo de 40,97% para tumores de orofaringe<sup>21</sup>. Diante dos fatos expostos concordamos com as opiniões de outros autores<sup>11,24,37-41</sup> que consideram que o HPV como um fator de risco na etiologia do carcinoma epidermóide de orofaringe.

Quanto às diferenças populacionais estas também podem ser constatadas na análise de uma revisão sistemática que avaliou estudos de detecção tecidual do DNA do HPV em vários continentes<sup>1</sup>. Para países europeus e asiáticos esta taxa ficou entre 16% e 33%<sup>1</sup>, porém quando considerada a população latinoamericana esta taxa variou entre 43,5% a 60% para carcinomas epidermóides da cavidade oral<sup>42,43</sup>. Corroboramos com a opinião de recentes estudos, que tem demonstrado que as taxas de detecção do DNA do HPV em cavidade oral têm aumentado, mesmo em populações mais conservadoras como a população iraniana<sup>22</sup>. Ernster et al.<sup>37</sup> em estudo epidemiológico nos Estados Unidos demonstraram que a razão HPV positivo/negativo aumentou de 0,72 antes de 1995 para 3,81 após este período.

Um dos métodos utilizados mais sensíveis é a PCR e entre os oligonucleotídeos iniciadores mais empregados em pesquisas de DNA viral para o HPV estão: MY09/MY11<sup>46</sup> e GP5+/GP6+<sup>47</sup>, ambos utilizados em nosso estudo em reação nPCR. Esta diferença metodológica fica clara quando comparamos, por exemplo, os resultados do HPV positivo em tecido do grupo de pacientes sem carcinoma de nosso estudo (22,5%) com os resultados do estudo de Sacramento et al.<sup>48</sup>, em uma população brasileira, porém mais jovem (média de idade = 28 anos), sendo a maioria de mulheres (58%) e utilizando a PCR com um oligonucleotídeo de maior tamanho (MY09/MY11 com 450 pb) que resultou em uma positividade de 14%.

Em relação às variáveis estudadas não encontramos diferenças significativas em nosso estudo quanto à idade entre os Grupos HPV negativo e HPV positivo, resultados concordantes com os estudos de Gillison, Koch et al.<sup>11</sup>

e Báez et al.<sup>49</sup>. Apesar disso, a média de idade dos pacientes do estudo foi alta (60 anos para casos versus 58 anos para controles) e não podemos discordar com os resultados dos estudos de Ringstrom et al.<sup>24</sup>; Smith et al.<sup>33</sup>; Smith et al.<sup>25</sup> e Fakry et al.<sup>12</sup> que revelaram que o HPV foi mais associado à pacientes com menor idade. Smith et al.<sup>33</sup> ainda justificam o fator idade considerando que o vírus é sexualmente transmitido e que os pacientes mais jovens têm mais atividade sexual.

Alguns estudos não encontraram diferenças estatísticas entre a presença de HPV em ambos os sexos<sup>11,49-53</sup>, porém contradizendo outros estudos que revelaram que o grupo HPV era formado predominantemente por mulheres<sup>43,54-56</sup>. No presente estudo encontramos diferença estatisticamente significativa entre a presença do HPV e a variável sexo ( $p=0,013$ ), sendo que o grupo HPV positivo era formado predominantemente por homens, ratificando dados de estudos anteriores<sup>24,34,46,57</sup>. A princípio, não vemos explicações ou motivos para existir uma correlação entre o gênero e a presença do HPV, exceto para os parceiros de mulheres com displasia cervical<sup>58,59</sup>.

Alguns autores relatam que no Grupo HPV positivo, os pacientes são compostos predominantemente por não tabagistas ou que fumam menos.<sup>25,33,37,38,60,61</sup> Em nosso estudo, assim como em outros anteriores<sup>11,49</sup> não houve diferença significativa entre tabagistas e não tabagistas na análise de sangue ( $p=0,389$ ), secreção salivar ( $p=0,500$ ) ou tecido ( $p=0,307$ ) dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de orofaringe. A infecção pelo HPV parece ser independente da exposição ao tabaco.<sup>11,25,36,51,62,63</sup> Sabe-se que o fumo, normalmente, induz uma maior queratinização do epitélio, o que, por sua

vez, torna as mucosas da cavidade bucal e orofaringe mais resistentes a traumas secundários, proporcionando um efeito protetor à infecção pelo HPV.<sup>11</sup> Por outro lado, há indícios de que o HPV seja um fator importante no desenvolvimento de câncer de boca em pacientes não-tabagistas.<sup>54</sup> D'Souza et al.<sup>44</sup>, não encontraram relação de sinergismo entre o HPV e uso de tabaco e álcool e sugeriram que há mecanismos distintos no desenvolvimento do câncer de orofaringe: um predominantemente associado aos efeitos do tabaco e álcool e outro induzido pela instabilidade genômica devido ao HPV.

No presente estudo, os pacientes etilistas apresentaram o DNA do HPV em uma porcentagem superior em relação aos abstêmios (41% versus 11% avaliados no tecido), mas não a ponto de valores estatisticamente significante, concordando com alguns autores<sup>11,42,49</sup> e discordando de outros que revelam que no grupo HPV positivo há maior quantidade de pacientes não alcoólatras ou que bebem menos.<sup>24,33,38,55,60,61,64</sup> Vale lembrar que não há padronização da quantidade de álcool nos trabalhos revisados. Assim como outros autores,<sup>11,25,36,42,51,62,63</sup> cremos que estes dois fatores de risco (álcool e fumo) atuem de forma independente do HPV na carcinogênese oral, entretanto não podemos descartar a possibilidade de um efeito sinérgico ou antagônico entre estes agentes etiológicos e a presença do vírus.

Neste trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na análise da variável grau de diferenciação histológico, o que ratifica alguns estudos,<sup>24,37,49</sup> porém discorda de outros<sup>11,25,53</sup> que relatam que os tumores com presença do HPV são pobremente diferenciados. Em relação ao grau de diferenciação, o DNA do HPV estava presente em 63% dos tumores

moderadamente diferenciados e 17 % dos pouco diferenciados avaliados no presente estudo. Segundo Bouda et al.,<sup>20</sup> Ringstrom et al.<sup>24</sup> e Sugiyama et al.<sup>65</sup> a maior prevalência do HPV em tumores bem e moderadamente diferenciados pode ser explicada pelo fato deste estar relacionado à fase inicial da carcinogênese bucal.

Dados de nosso estudo ainda mostram que não há relação entre a presença do HPV e o estadiamento clínico, corroborando com os achados de Ringstrom et al.<sup>24</sup>, Ernster et al.<sup>37</sup>, D'Souza et al.<sup>44</sup>, Baez et al.<sup>49</sup>, Reimers et al.<sup>53</sup> e Klussman et al.<sup>61</sup>. Em nossa casuística tivemos 70 % dos nos pacientes portadores de carcinoma de boca e orofaringe em estádios III e IV e ainda assim verificamos alta prevalência do vírus (12/16) nestes estádios. Por outro lado para Lindel et al.<sup>55</sup> e Mellin et al.<sup>60</sup> tumores com estadiamento clínico avançado (estádios III e IV) são menos infectados pelo HPV.

Apesar das amostras positivas terem sido submetidas à purificação e serem processadas em um seqüenciador automático a tipagem dos HPVs encontrados não foi possível utilizando este método.



**Conclusões**

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a metodologia descrita permitiram concluir que:

1. A presença de partículas virais do DNA do HPV nos diferentes materiais biológicos de pacientes portadores de carcinoma de orofaringe estudados não apresentou diferenças estatisticamente significativas na análise das variáveis: idade, consumo de fumo e álcool, estadiamento clínico e gradação histológica.
2. Houve diferença significativa entre a positividade para o DNA do HPV em relação à variável sexo na análise de tecido de pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe.
3. A presença de partículas virais do DNA do HPV nos diferentes materiais biológicos de pacientes sem carcinoma estudados não apresentou diferenças estatisticamente significativas na análise das variáveis: idade e sexo.
4. Houve diferença significativa entre os usuários de tabaco e álcool e os pacientes que não tinham hábitos consumo de fumo e álcool na análise de secreção salivar dos pacientes sem carcinoma.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

### IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA

A Agência para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) atualmente reconhece o HPV como fator de risco para o câncer de orofaringe e dados moleculares e epidemiológicos agora mostram que os HPV's de alto risco são responsáveis por um sub-grupo de tumores de orofaringe.

O prognóstico para os tumores de cabeça e pescoço são geralmente piores nos estádios mais avançados tendo o cirurgião a necessidade de realizar um tratamento oncológico cirúrgico mais extenso e como consequência frequentemente estes pacientes apresentam seqüelas como por exemplo dificuldades na alimentação, na fonética, xerostomia e osteoradionecrose. Desta maneira o tratamento oncológico tem se voltado na direção oposta incluindo alterações nos esquemas de radioterapia, integração da radioterapia e quimioterapia e introdução de terapia biológica, o que tem aumentado a sobrevida para os pacientes portadores de carcinomas de cabeça e pescoço. Não há entretanto um consenso sobre qual a terapia seria melhor para determinado paciente.

Recentes estudos tem mostrado que os pacientes com tumores HPV positivos de orofaringe mostram uma melhora na sobrevida independente da estratégia de tratamento, a questão porém é o quanto este tratamento necessita ser agressivo para este sub-grupo de pacientes, portanto baseados no profundo impacto da respostas ao tratamento dos pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos poderia ser incluída como rotina padrão uma análise da

positividade destes pacientes para o DNA do HPV nos tecidos tumorais para melhor planejamento das estratégias de tratamento.

## IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA

Os tumores de orofaringe HPV-positivos apresentam um perfil clínico-patológico distinto e no momento ainda existem várias questões a ser respondidas a respeito da biologia e carcinogênese destes tumores.

No futuro as pesquisas sobre tumores de orofaringe deveriam levar em conta o status do HPV, principalmente visando a melhora na escolha da terapia para estes pacientes, visto que os pacientes HPV positivos são mais jovens e teriam que conviver mais tempo com seqüelas se ainda continuar a se adotar as terapias vigentes atualmente.

Outra implicação importante seria monitorar o status do HPV com leucoplasias que não pudessem ser retiradas na sua totalidade, uma vez que a persistência da infecção pelo HPV poderia aumentar o índice de transformação carcinogênica nestes casos.

## REFERÊNCIAS

1. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-475.
2. World Health Organization. World Cancer Report 2008. Boyle P, Levin B, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2009.
3. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*. 2009;88(4):300-6.
4. Chuang AY, Chuang TC, Chang S, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44(10):915-919.
5. Gillespie MB, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N. Human Papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Curr Treat Options Oncol* 2009;10(5-6):296-307.
6. Cuberos V, Perez J, Lopez CJ, et al. Molecular and serological evidence of the epidemiological association of HPV 13 with focal epithelial hyperplasia: a case-control study. *J Clin Virol* 2006;37(1):21-26.
7. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2006;35:338-344.
8. Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005; 99(3):615-621.

9. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5428-5434.
10. Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, et al. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;117:605-610.
11. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-720.
12. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(4):261-269.
13. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008; 19(10):1681-1690.
14. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol* 2009;1(1):36.
15. 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.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6nd ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
17. Broders AC. Carcinoma: grading and practical applications. *Arch Pathol Lab Med* 1926;2:376-381.

18. Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL, et al. Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis* 2005;9(4):219-224.
19. Uobe K, Masuno K, Fang YR, et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol* 2001; 37:146-152.
20. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, 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):644-653.
21. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2010;2:15.
22. Saheb Jamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashi Moghadam F, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14 (10):e525-528.
23. Giovannelli L, Campisi G, Colella G, et al. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther* 2006;10(1):49-55.
24. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187-3192.
25. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human Papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(6):449-555.
26. Adamopoulou M, Vairaktaris E, Panis V, Nkenke E, Neukam FW, Yapijakis C. HPV detection rate in saliva may depend on the immune system efficiency. *In Vivo* 2008;22:599-602.

27. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23):1772-1783.
28. Capone RB, Pai SI, Koch WM, et al. Detection and quantitation of Human Papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(11):4171-4175.
29. Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, et al. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* 2009;81(5):878-887.
30. Chen AC, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA, Antonsson A. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol* 2009;81(10):1792-1796.
31. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson 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;125:1337-1344.
32. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-747.
33. Smith E, Ritchie J, Summersgill K, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108(5):766-772.
34. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104(3):336-344.
35. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004;363:1488-1489.

36. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-635.
37. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope* 2007;117(12):2115-2128.
38. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24:2606-2611.
39. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007;120(11):2386-2392.
40. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 2007;30(4):813-823.
41. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31(4):259-266.
42. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: A case-control study. *Arch Med Res* 2008;39(2):189-197.
43. Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 2004;10(3):163-166.
44. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-1956.

45. Giovannelli L, Bellavia C, Capra G, et al. HPV group- and type-specific concordance in HPV infected sexual couples. *J Med Virol* 2007;79(12):1882-1888.
46. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(1):71-74.
47. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, et al. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004;30(4):302-308.
48. do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, et al. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J Med Virol* 2006;78(5):614-618.
49. Báez A, Almodovar JI, Cantor A, et al. High frequency of HPV 16 associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck* 2004;26:778-784.
50. Tachezy R, Klozar J, Saláková M, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11(3):181-185.
51. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of p16INK4A, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(3):344-352.
52. Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150(1):44-49.
53. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007;120(8):1731-1738.

54. 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;120(6):909-916.
55. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-813.
56. Mellin H, Friesland S, Auer G, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus and DNA ploidy in tonsillar cancer - correlation to prognosis. *Anticancer Res* 2003;23(3C):2821-2828.
57. Ibieta B, Lizano M, Fras-Mendivil M, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(3):311-315.
58. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:433-437.
59. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, et al. HPV prevalence among healthy Italian male sexual partners of women with cervical HPV infection. *J Med Virol* 2008;80(7):1275-1281.
60. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89( 3):300-304.
61. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92(11):2875-2884.
62. Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 2002;38(3):227-234.

63. Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, 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;9(7):2620-2626.
64. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with hpv16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1801-1810.
65. Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(5):594-600.

## ANEXO A - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Aracatuba

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-

OF. 047/2008  
CEP  
SFCD/bri

Aracatuba, 30 de abril de 2008.

## Referência Processo FOA 2008-00869

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto "COMPARAÇÃO TECIDUAL, SALIVA E SORO PLASMÁTICO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES NORMAIS E PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL" expedir o seguinte parecer:

**Aprovado:**

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatórios parciais em 29/04/2009 e 29/04/2010 e o relatório final em 29/04/2011.

*[Handwritten Signature]*  
Prof. Dr. Stefan Fiuza de Carvalho Dekon  
Coordenador do CEP

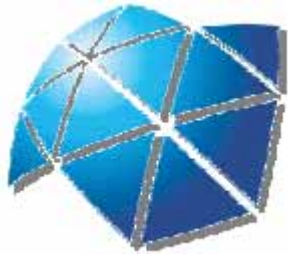
Ilmo. Senhor  
Dr. GLAUCO ISSAMU MIYAHARA  
Aracatuba-SP-

Ciente. De acordo.

*[Handwritten Signature]*

Dr. Glauco Issamu Miyahara

## ANEXO B - FICHA COLETA DADOS



### UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

*Faculdade de Odontologia – Câmpus de Araçatuba  
Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica  
Disciplina de Estomatologia*

Pesquisa: Comparação tecidual, saliva e soro plasmático da presença do papilomavírus humano (HPV) em pacientes normais e portadores de carcinoma epidermóide oral.

Pesquisador: Adriana Demathé

Nome do paciente:.....

Nº do caso:.....Nº do prontuário: .....

1 - Sexo: (1) masculino (2) feminino

2 - Raça: (1) branca (2) não branca 3 – Idade:.....

4 - Tabagista: (1) sim (2) não

5 - Etilista: (1) sim (2) não

6a - Categoria T: (1)To (2) Tis (3)T1 (4)T2 (5)T3 (6)T4 (7)Tx

6b - Categoria N: (1)No (2)N1 (3)N2a (4)N2b (5)N2c (6)N3 (7)Nx

6c - Categoria M: (1)Mo (2)M1 (3)Mx

7 - Anatomopatológico:

(1) bem diferenciado (2) moderadamente diferenciado (3) pouco diferenciado

8 – Estádio Clínico:

(1) Estádio I (2) Estádio II (3) Estádio III (4) Estádio IV

9 - Status:

(1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer oral

(4) morte sem outras especificações (5) perda do segmento

## ANEXO C – CLASSIFICAÇÃO TNM TUMORES CAVIDADE ORAL

T - Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
N - Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Homolateral, único, < 3 cm
N2	(a) Homolateral, único, > 3 até 6 cm (b) Homolateral, múltiplo, < 6 cm (c) Bilateral, contralateral, < 6 cm
N3	> 6 cm
M - Metástase à Distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

## ANEXO D - Normas do Periódico – Journal American Dental Association – JADA

### Submissions & Author Guidelines

#### Manuscript Submission

**New manuscripts.** All new manuscripts must be submitted via JADA's online submission and review Web site, [JADA ScholarOne Manuscripts](#) (Authors who do not yet have an account on the Web site should click the "Create Account" link on the upper right-hand corner of the JADA ScholarOne Manuscripts welcome page and follow the step-by-step process to open an account.). On the dashboard page, authors should select the Corresponding Author Center. In the Corresponding Author Center, they should click the "Click here to submit a new manuscript" link.

*Author identification.* The author should include a letter providing each author's name, degrees, professional title, work affiliations, complete address, telephone and fax numbers, and e-mail address. That cover letter can be typed in on the JADA ScholarOne Manuscripts site in the field provided, or it can be uploaded to the site as a word-processed document.

*Originality and exclusivity.* The JADA Editor will consider only articles that are original, have not been published elsewhere and have been submitted exclusively to JADA.

*Registration of clinical trials.* JADA recommends, but does not require, that clinical trials be registered with a national database such as [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). When a clinical trial has been registered prior to publication in JADA, it will be noted in The Journal.

**Revised manuscripts.** After the manuscript has gone through review, the JADA Editor makes a decision as to its disposition: accept; minor revision; major revision; reject. In all but the first and last cases, the author will be invited to submit a revised manuscript via JADA ScholarOne Manuscripts.

#### Manuscript Designation

When published, manuscripts will be placed in one of the JADA departments listed below. Authors should indicate the department for which they are submitting a manuscript, with the understanding that the editor might deem the manuscript better suited to a different department.

Unless otherwise noted, manuscripts must be no longer than 10 double-spaced pages (roughly 3,000 words), exclusive of title page, abstract, acknowledgments, references and illustrations (tables, figures, text boxes).

### **Peer-Reviewed Articles**

*Clinical Practice.* Articles with a clinical and practical focus. Potential topic areas include esthetic and restorative care, oral-systemic health, pharmacology, specialty dental practice, and informatics and technology.

- **Brief Reports.** Short articles focusing on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages). The articles formerly included in the “Clinical Directions” department are included in the Brief Reports category. Pilot studies also would be appropriate for this section.
- **Case Reports.** Short articles describing the presentation, diagnosis and management of clinical cases (6 double-spaced pages).
- **Critical Review.** Review articles using a systematic approach to describe what is known from the literature about a clinical dental topic and evaluating the strength of the evidence (10 double-spaced pages).
- **Full Article.** Full-length articles with a clinical and practical focus.
- **Practical Science.** Articles providing scientific information on critical issues of practical interest to general dentists, helping to bridge the gap between dental research and patient care (10 double-spaced pages).

*Practice Management.* Practical information about the day-to-day aspects of running a dental practice, as well as about broader management concepts and techniques. Articles on informatics and technology could appear here if the technology being discussed has a management rather than a clinical focus (10 double-spaced pages).

*Research.* Articles describing the results of clinical, laboratory and population-based research pertinent to dentistry and providing foundation knowledge for future application.

- Full Article. Full-length articles describing potential clinical applications of research findings (10 double-spaced pages).
- Brief Reports. Short articles focusing on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages).
- Advances in Dental Products. Articles describing research on new products useful to the clinician. Research sponsored or substantially funded by manufacturers appears here (10 double-spaced pages).

### *Trends*

- Full Article. Articles describing trends in dentistry and health care, such as access to care; patient and practitioner demographics; economic, ethical and societal issues; state and federal law, policy and regulations that affect dentistry; and surveys of dentists on topics of interest (10 double-spaced pages).
- Brief Reports. Short articles focusing tightly on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages).

### **Non-Peer-Reviewed Material**

*Letters to the Editor.* Brief comments on issues raised and articles published in JADA. A letter about a particular article will be forwarded to the article's author for comment, if the letter is selected for publication. The JADA Editor reserves the right to edit the letters into a publishable format (550 words, maximum of five references, no illustrations). A letter concerning a recent JADA article will have the best chance of acceptance if it is received within two months of the article's publication. Letter writers are asked to disclose any personal or professional affiliations or conflicts of interest that readers may wish to take into consideration in assessing their stated opinions. Brevity is appreciated. By sending a letter to the editor, the author acknowledges and agrees that the letter and all rights of the author in the letter become the property of The Journal. Letters may be submitted via e-mail to [jadaletters@ada.org](mailto:jadaletters@ada.org); by fax to 1-312-440-3538; or by mail to 211 E. Chicago Ave., Chicago, Ill. 60611-2678.

## Manuscript Format

**Technical specifications.** Manuscripts submitted to JADA must be prepared in Microsoft Word. No manuscripts prepared in WordPerfect or other word processing software can be reviewed. Manuscripts prepared in Word 2007 must be saved down to Word 2003 format. Also, no illustrations or other material prepared in PowerPoint will be accepted for review. If your material was prepared in PowerPoint, please copy it into a Microsoft Word document or submit it as a PDF, a JPEG, a TIFF or an EPS file.

*Length.* Unless otherwise noted above, manuscripts must be no longer than 10 double-spaced pages (roughly 3,000 words), exclusive of title page, abstract, acknowledgments, references and illustrations.

NOTE: The Journal does not accept submissions of serial articles (Part I, Part II, etc.).

**Page setup.** Pages should have 1-inch margins and must be numbered consecutively throughout the document.

**Title page.** Each manuscript should have a title page bearing the complete title of the manuscript and complete information on all authors. It should be the first page of the manuscript.

- Each author's degrees must be listed on the title page. JADA generally does not publish U.S. fellowships and honorary degrees and designations. Degrees below the master's level generally are not listed, unless they are the highest degree attained.
- The title page should designate the corresponding author and list that author's complete mailing address for the purposes of directing reprint requests after publication.

**Abstract.** A separate section describes how to format structured abstracts.

**Authors.** The people listed as authors should be those who made an intellectual contribution to the manuscript. All authors should be listed with their affiliations, their academic degrees and their scientific or clinical contributions to the paper. The editor and publisher reserve the right to ask for justification for each author's inclusion.

**Acknowledgments.** Acknowledgments should be submitted on a separate page.

**Illustrations.** A maximum of four figures—charts, graphs or photographs—and four tables may be submitted. (See next paragraph for an exception to this rule.) Each separate chart, graph or photograph will be counted as a separate illustration; illustrations should not be grouped together as a single illustration. Tables and figures should augment, not repeat, the text. Figures and tables should be numbered consecutively according to the order in which they are cited in the text. Regarding clinical figures, JADA will accept only digital files of at least 4 inches (roughly 100 millimeters) in width and at least 300 or more dots per inch and in JPEG, TIFF or EPS format. These may be uploaded on JADA ScholarOne Manuscripts. JADA cannot accept original histologic slides and radiographs. However, The Journal will accept digital files of radiographs, magnetic resonance images and magnetic resonance angiograms. The publisher reserves the right to reject any figure that does not meet the necessary quality standards for publication.

- (Exception. For only articles on esthetic care, authors are invited to provide sufficient numbers of high-quality photographs to present their material comprehensively, provided that there is an appropriate ratio of text to photographs: the length of the manuscript must be sufficient to support placement of photographs within the text. As a rule of thumb, assume an outside limit of three photographs per manuscript page.)

Any patient who is clearly identified in the article (either in text or in photographs) must sign a form indicating his or her consent to be thus depicted in the article. This [consent form](#) (PDF) must be submitted with the manuscript.

## **Manuscript Style**

**Basic style/writing requirements.** The foundation of JADA style is the most recent edition of the American Medical Association Manual of Style. The purpose of any piece of writing is to deliver information. This requires the author to define his or her message and to present it in a way that is readily understood by and engaging to the reader. Manuscripts should be written in active voice and declarative sentences for a clear, concise style. The overall tone of these reports should be factual and professional, and thus suitable for a scholarly journal. Authors are allowed to express a personal opinion as long as the basis for that opinion is stated plainly. For example, an author may express an opinion “based on long experience and intensive observation.” Other statements of opinion and all

statements of fact require references from the appropriate published literature (dental, medical, epidemiologic, practice management, etc.).

**Manuscript title.** Authors are invited to write titles for their articles. Titles should be as brief as possible while clearly conveying the main point or purpose of the article. Short subheads also should be used throughout the article to highlight key points. All submissions, including titles and subheads, are subject to change during the editing process.

**Statistical material.** Authors are encouraged to include confidence intervals (CIs) with all *P* values.

**References.** All published references should be cited in the text and numbered consecutively. No references should be cited in the abstract. Each reference should be cited only once; on subsequent citations, the original number should be used. Personal communications and unpublished data should not be numbered, but should be cited in the text as follows:

(G Edmunds, DDS, oral communication, November 2004)

Authors citing sources from the World Wide Web should make use of WebCite. WebCite is an entirely free service for authors who want to refer to Web material, regardless of the publication for which they are writing. It is an archiving system for Web references (cited Web pages and Web sites) that can be used by authors, editors and publishers of scholarly papers and books to ensure that cited Web material will remain available to readers in the future. If Web references cited in JADA articles are not archived, future readers may encounter a "File Not Found" error when clicking on a cited URL. A Web citation archived on [www.webcitation.org](http://www.webcitation.org) will not disappear in the future.

Citations in the reference list should follow this basic style:

- Periodical
  1. Lauterbach M, Martins IP, Castro-Caldas A, et al. Neurological outcomes in children with and without amalgam-related mercury exposure: seven years of longitudinal observations in a randomized trial. JADA 2008;139(2):138-145.
- Book
  2. Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 8th ed. St. Louis: Mosby; 2002:196.
- Book
  3. Byrne BE, Tibbetts LS. Conscious sedation and agents for the control of chapter

anxiety. In: Ciancio SG, ed. ADA Guide to Dental Therapeutics. 3rd ed. Chicago: American Dental Association; 2003:17-53.

- Government publication  
4. Medicine for the public: Women's health research. Bethesda, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 2001. DHHS publication 02-4971.
- World Wide Web site  
5. Hoffman ED, Klees BS, Curtis CA. Brief summaries of Medicare & Medicaid: Title XVIII and Title XIX of the Social Security Act as of November 1, 2007. Baltimore, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Medicare & Medicaid Services, Office of the Actuary; 2007. "<http://www.cms.hhs.gov/MedicareProgramRatesStats/downloads/MedicareMedicaidSummaries2007.pdf>". Accessed Aug. 28, 2008.
- Publication in press  
6. McCoy J. Alteration in periodontal status as an indicator of general health. JADA (in press). NOTE: Authors should double-check the status of any in-press work cited in their reference lists before submitting the final manuscript to JADA.
- Presentation  
7. Eichenstadt L, Brenner T. Caries levels among low-income children: report of a three-year study. Paper presented at: 146th Annual Session of the American Dental Association; Oct. 7, 2005; Philadelphia.

## Review

**Peer review.** Articles in JADA are subject to a single-blinded peer review process: reviewers know the identity of a manuscript's author(s), but authors do not know the identity of the reviewers. (Authors do have an opportunity to suggest reviewers on JADA ScholarOne Manuscripts; they also have an opportunity to request the exclusion of particular reviewers from critiquing their manuscript. NOTE: Authors may not include as a preferred reviewer anyone who works at their own institutions.) Reviewers keep their critiques strictly confidential. Because the

reviewers volunteer their time, reviews may take from three to four weeks to complete.

**Decision.** Once the reviewers have completed their critiques, the editor examines their comments and makes a decision about the manuscript's disposition: accept, minor revisions, major revisions, or reject.

**Editing.** JADA reserves the right to edit manuscripts to ensure conciseness, clarity and stylistic consistency and to fit articles to available space. After accepted articles are edited, they are returned to the authors for review and comment before publication. Authors will have the opportunity to review a PDF proof of their articles after they are typeset.

### **Authors' Responsibilities**

**Ethical approval of studies and informed consent/assent.** For all manuscripts reporting data from studies involving human participants, human specimens or animals, JADA requires that the study have received formal review and approval, or formal review and waiver, by an appropriate institutional review board or ethics committee. This review and approval or waiver should be described in the manuscript's Methods section. Authors may be asked to request that the institutional review board provide directly to the editor documentation of the formal review and recommendation from the body responsible for ethical oversight of the study. For investigations involving humans or human specimens, authors should state in the Methods section that they obtained informed consent/assent from the study participants.

**Personal communications and unpublished data.** JADA requires that authors request and receive permission from each person identified in the manuscript as a source of information in a personal communication or as a source for unpublished data. By submitting their manuscripts, authors represent and warrant to JADA that such permission has been obtained, if applicable. JADA strongly recommends that such permissions be in writing and that authors should maintain the signed statements in their records for a reasonable period of time after publication of their work in JADA. Authors must specify in the manuscript the date of the communication or the data, as well as whether the communication was written or oral.

**Copyright transfer.** The American Dental Association owns the copyright for all editorial content published in The Journal. A statement requiring copyright transfer from authors, signed by each author, must be submitted with the manuscript. The [copyright transfer form](#) (PDF) may be reproduced. Manuscripts submitted without the requisite Copyright Transfers will not be reviewed unless and until JADA's Editor receives a valid, executed JADA Copyright Transfer Agreement from each author. (The Copyright Transfer form may be scanned and uploaded on Manuscript Central or may be faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053.) If the manuscript is rejected by the ADA, all copyrights in the manuscript will be retained by the author(s). All accepted manuscripts and their accompanying illustrations become the permanent property of the American Dental Association and may not be published elsewhere in full or in part, in print or electronically, without written permission from the ADA's Publishing Division.

**Reprint permission.** If the manuscript contains any material, either text or illustrations, that is either exactly reproduced or adapted from a published source, the author is responsible for obtaining written permission from the publisher of that source work—or the person or agency holding the copyright, if not the publisher—to reproduce the material in JADA. JADA will not reproduce such material without written permission. The [official JADA template letter](#) (DOC) for this purpose is available online in Microsoft Word format. The author must submit a copy of the permission letter and provide JADA with complete citation information for the reproduced material.

**Consent forms.** Any person who is clearly identified in the article (either in text or in photographs) must sign a form indicating his or her consent to be thus depicted in the article. This [consent form](#) (PDF) must be submitted with the manuscript.

**Response to letters to the editor.** An author whose article is published in JADA is expected to prepare a response to any letter to the editor about his or her article that the editor deems appropriate for publication. (For further information, see the Letters to the Editor section above under Manuscript Designation, Non-Peer-Reviewed Material.)

## **Disclosure**

Each author must disclose any financial, economic or professional interests that may influence positions presented in the article. This disclosure will be published with the article. The [conflict of interest form](#) (PDF) on which disclosure must be

made is available online in PDF format and may be reproduced. The form must be signed by each author and submitted with the manuscript (either scanned and uploaded on Manuscript Central or faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053). Manuscripts submitted without the form will not be reviewed until JADA receives the signed form.

### **Open Access Policy**

The full text of all journal content will be open to the public at no cost on <http://jada.ada.org> one year after publication and will link to PubMed Central, the digital library of the National Institutes of Health, and to Google Scholar. This includes all content posted on <http://jada.ada.org> from January 1995 through one year prior to the present. All JADA Copyright Transfer Forms will require that the author relinquish posting and distribution rights of their manuscripts to the ADA prior to acceptance; otherwise, the manuscript will not be published.

### **Return to Top**

### **National Institutes of Health Public Access Policy: Authors' Responsibilities**

The National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy implements a law passed in December 2007 that affects authors who receive funding from the NIH. Effective April 7, 2008, the law mandates that all peer-reviewed articles that arise, in whole or in part, from direct costs funded by NIH, or from NIH staff, that are accepted for publication by a peer-reviewed journal—including JADA—must be deposited with the National Library of Medicine's PubMed Central, in the form of a copy of the manuscript's final version on its acceptance. NIH provides a Web site

at <http://publicaccess.nih.gov> that contains answers to questions authors may have about this policy.

On or after April 7, 2008, when the author deposits the accepted manuscript with PubMed Central, he or she should specify that the manuscript is not to be made available until 12 months after publication (not acceptance). Thereby, the manuscripts will be made publicly available by PubMed Central at the same time that JADA makes its full text available to the public free of charge.

JADA holds the copyright to all material it publishes except for material authored solely by U.S. government employees. Please see the [JADA Copyright Transfer form](#) (PDF) for further details.

### **Checklist**

If any of the following statements applies to you, or any co-author of your article, you are required to deposit your manuscript, if accepted, with PubMed Central.

- directly funded by an NIH grant or cooperative agreement active in Fiscal Year 2008 (October 1, 2007-September 30, 2008) or beyond
- directly funded by a contract signed on or after April 7, 2008
- directly funded by the NIH Intramural Program
- paid a salary by NIH

### **Author's Preprints and Complimentary Copies**

On publication, each article's primary author will receive 25 complimentary copies of the article. In addition, he or she will receive two copies of the JADA issue containing the article. Before publication, the author will have an opportunity to order additional preprints at a special prepublication discount. Otherwise, authors may purchase reprints post-publication at the higher prevailing rate.

### **Reprinting of Material Published in JADA**

All accepted manuscripts and their accompanying illustrations become the permanent property of the American Dental Association, owner and publisher of JADA, and may not be published elsewhere in full or in part, in print or electronically, without written permission from the American Dental Association. Any party seeking individual or multiple copies of material published in JADA must request permission in writing from the Permissions Editor, Publishing Division,

American Dental Association, 211 E. Chicago Ave., Chicago, Ill. 60611. The request must state exactly what material is being borrowed, the issue in which it was published, the intended use of the material being borrowed, the name of the publication in which the reprinted material will appear (if applicable), the print quantity of distribution, the audience and whether the use is for financial gain.

Further guidelines on reprinting are available from the publisher.

### **Publicity**

Any publicity (press releases, press coverage, etc.) about articles published in JADA must be coordinated through the ADA Public Affairs Department (phone 1-312-440-2806, e-mail [mediarelations@ada.org](mailto:mediarelations@ada.org)).

### **Submission Checklist**

Before submitting a manuscript, the author should make sure he or she has completed all the necessary steps.

- Electronic files of the manuscript and each table and figure should be uploaded.
- A copyright transfer statement and a conflict of interest form, signed by each author, should be either scanned and uploaded to JADA ScholarOne Manuscripts or faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053. Please do not submit your forms until you submit your manuscript.
- The cover letter should indicate the JADA department to which the manuscript is being submitted.
- The manuscript should include a structured abstract in the proper format (according to the JADA department to which it is being submitted).
- All references should be checked for accuracy, correct format and completeness.
- If applicable, acknowledgments should be included in the manuscript on a separate page.
- Complete information—name, degrees, position or title, address, phone and fax numbers, e-mail address—should be included for the corresponding author.