

LEANDRO TOYOJI KAWATA

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE
ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.
CORRELAÇÃO COM DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICO-
PATOLÓGICOS E DE SOBREVIVÊNCIA**

Araçatuba
2007

LEANDRO TOYOJI KAWATA

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO
EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE
ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.
CORRELAÇÃO COM DADOS DEMOGRÁFICOS,
CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DE SOBREVIVÊNCIA**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de
Araçatuba, para obtenção do Título de Doutor
em Odontologia, área de concentração em
Estomatologia.**

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Co-orientador: Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli

**Araçatuba
2007**

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

K22d Kawata, Leandro Toyoji
Detecção do papilomavírus humano em carcinoma
espinocelular de orofaringe através da reação em cadeia da
polimerase. Correlação com dados demográficos,
clínico-patológicos e de sobrevida / Leandro Toyoji Kawata. -
Araçatuba : [s.n.], 2007. 70 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Odontologia, Araçatuba, 2007

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Co-orientador: Eder Ricardo Biasoli

1. Neoplasias orofaríngeas 2. Papillomaviridae
3. Reação em cadeia da polimerase

Black D6
CDD 617.632

DADOS CURRICULARES

Leandro Toyoji Kawata

- NASCIMENTO - 19.02.77 – Araçatuba – SP
- FILIAÇÃO - Tadami Kawata e Laurinda Yoshie Tada Kawata
- 1996 – 2000 - Curso de Graduação: Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.
- 2001 – 2003 - Curso de Aprimoramento Profissional da Secretaria do Estado de São Paulo em Odontologia Hospitalar, realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, com carga horária de 3.400 horas.
- 2003 – 2004 - Curso de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Estomatologia, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.
- 2005 – 2007 - Curso de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Estomatologia, nível de Doutorado, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.

DEDICATÓRIA

A Deus, por me proteger durante os milhares de quilômetros viajados durante esses anos de pós-graduação.

À minha família:

- ✓ meus pais: ***Tadami*** e ***Laurinda***, pelo apoio incondicional, amor e carinho e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis...
- ✓ meu irmão: ***Marcel*** pelo carinho, pelas conversas, pela amizade, pelo exemplo de raça e dedicação para com seus objetivos...
- ✓ minha irmã: ***Lauren*** pela amizade, compreensão, carinho, coerência e pelo exemplo de organização e profissionalismo...
- ✓ minha noiva: ***Eliane*** pelo amor eterno, pela paciência por aguardar o término dos meus estudos, por todos os momentos em que passamos juntos, pela dedicação e pela incrível pessoa que você é...

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, pela compreensão e ajuda no início deste trabalho, pela mão estendida no momento de indecisão, pela oportunidade de trabalhar com a biologia molecular e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli, pelas conversas descontraídas, pelo bom humor, pelas orientações, por sempre compartilhar seus conhecimentos sejam eles na área cirúrgica, didática ou pessoal, pela confiança e estímulo desde a graduação até nos dias de hoje.

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia e a Prof.^a Dra. Cáris Maroni Garcia, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- UNESP, pela autorização, auxílio e acompanhamento desta tese.

Muito Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Perri Moraes, pelos seus ensinamentos, pela boa convivência, pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof.^a Dra. Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld, pela ajuda com a análise estatística nesta Tese de Doutorado e em outros trabalhos, pelos seus ensinamentos e por sempre me atender com disposição e carinho.

A todos os professores da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, principalmente aos professores Wilson Roberto Poi, Alvimar Lima de Castro, Ana Maria P. Soubhia e Ana Cláudia Okamoto pelos laços de amizade nestes últimos anos e pela orientação em minha formação.

A todos os Amigos do Centro de Oncologia Bucal: Suzy Elaine Nobre de Freitas, Shirleni Cantieri Cavazana, Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva, Nair Ramos Macedo Cardoso e Juliana Benevenuto Reis pela convivência e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Érica de Souza Ribeiro, Michele Lamara Leite Bispo, Pedro Luis Florindo e Valquíria Rissato Gazola, pela oportunidade de trabalhar com vocês, pelos ensinamentos, pela atenção e pelos excelentes momentos de convivência.

Ao Instituto de Patologia de Araçatuba, na pessoa do Dr. Neivio José Mattar, Luiz Alberto Veronese e Deolino João Camilo Júnior e seus funcionários na pessoa do Sr. Maurício Alcântara de Lima, pela ajuda com os blocos parafinados, pela revisão das lâminas e por atender a todas as solicitações quanto às imagens dos exames histopatológicos.

À minha colega de pós-graduação Luciana Estevam Simonato, pela boa vontade e dedicação em me ensinar os princípios e técnicas da biologia molecular, pela ajuda no início deste trabalho e pela amizade construída.

Ao meu companheiro, colega de graduação e pós-graduação Daniel Galerá Bernabé, por sempre estar disposto a ajudar o próximo, por sua vontade de sempre querer fazer o melhor, pela sua bondade e amizade.

À minha colega de pós-graduação Adriana Demathé pela convivência no dia a dia do laboratório, pela ajuda nos momentos difíceis e pela amizade.

À Prof.^a Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva do Departamento de Apoio, produção e saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP e ao seu orientado Heitor Flávio Ferrari por me ajudarem nos momentos críticos da pesquisa.

A todos os alunos do curso de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, principalmente aos amigos: Rafael Akira Murayama, Henrique José Baldo, Marceli Moço Silva, Cristiane Fumiko Furuse, Cristiano Marinho Correa, Cleverson Luciano Trento, Evanice Menezes Marçal Vieira, Felipe Camargo Munhoz, Iraci Costa, Ana Carolina Prado Ribeiro, Thiago Marques Macedo, Ellen Greves Giovanini, João Paulo de Carli, Paulo de Tarso Coelho Jardim, Eni Lima de Castro e Cláudia Misue Kanno, pelo companheirismo e amizade.

A todos os funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba-UNESP pelo atendimento e orientação deste trabalho.

Ao Diogo Luis Reatto, Marina Midori Sakamoto Kawagoe e Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, funcionários da pós-graduação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba-UNESP, pela atenção e atendimento nesta etapa da minha vida.

Aos amigos Sérgio Yukio Ganda e Viviane Shinsato Higashi pelo apoio e pela amizade.

Ao Maurício e Silvia Tanisaki, Leonardo Yagima e Sueli Tomimura pela ajuda nos momentos de minha ausência de São Paulo.

Aos alunos da graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, principalmente aos estagiários do Centro de Oncologia Bucal: Mateus Pereira Alonso Soler, Igor Mariotto Beneti, Ana Paula Berenguer, Luana Barbosa, Rodrigo Yuji Takano, Cleide dos Anjos Santos, Deyves José de Freitas, Juliana Akemi Tsumura e Juliana Pompeo Bucilo pela boa convivência nestes anos.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela bolsa concedida.

À FUNDUNESP - Fundação para o Desenvolvimento da Unesp, pelo auxílio financeiro que viabilizou a compra de material para realização desse trabalho de pesquisa.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado!!!

EPÍGRAFE

"Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte as amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra."
Mark Twain

Kawata, LT. Detecção do papilomavírus humano em carcinoma espinocelular de orofaringe através da reação em cadeia da polimerase. correlação com dados demográficos, clínico-patológicos e de sobrevida. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Os resultados da presença do papilomavírus humano (HPV) em relação ao câncer das vias aerodigestivas superiores são muito controversos. Destas vias, a orofaringe tem sido a localização com maior prevalência de HPV, o que desperta grande interesse dos pesquisadores sobre a real participação do vírus na carcinogênese desta região. Este trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de HPV em pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe, através da reação em cadeia polimerase (PCR) e correlacioná-la com dados demográficos, clínico-patológicos e de sobrevida. O estudo foi realizado através da análise de 27 peças oriundas de blocos de parafina obtidos de pacientes portadores de carcinoma espinocelular de orofaringe diagnosticados e tratados no Centro de Oncologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Foram realizadas extrações do DNA com o QIAamp DNA minikit, conforme instrução do fabricante. Após confirmar a presença e integridade do DNA, foi realizada a nPCR para detecção do HPV. Dois grupos foram formados considerando-se a presença ou ausência do HPV. Foram amplificadas 26 amostras para o gene β -globina sendo que o HPV foi detectado em 50% dos casos estudados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação as variáveis clínico-patológicas e a sobrevida.

Palavras-chave: Neoplasias orofaríngeas. Papillomaviridae. Reação em cadeia da polimerase.

Kawata LT. Detection of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. Correlation with demographic data, clinicopathological aspects and survival [thesis]. Aracatuba: UNESP – Sao Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

Reports on the presence of human papillomavirus (HPV) in upper aerodigestive tract are very controversial. In this tract, the oropharynx has been the site with the highest prevalence of HPV, which encourage the great interest of researchers for the real role of the virus in the carcinogenesis of this area. This study had the objective of verifying the HPV prevalence in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma using polymerase chain reaction (PCR) and its correlation with demographic data, clinicopathological aspects and survival. This study was accomplished by the analysis of embedded paraffin tissues of oropharyngeal squamous cell carcinoma from 27 patients diagnosed and treated in São Paulo State University, Dentistry College of Araçatuba – UNESP. DNA extraction was accomplished with QIAamp DNA minikit, according to the manufacturer's protocol. After confirming the presence and integrity of DNA, nPCR for HPV was performed. Two groups were formed, considering patients with HPV and without HPV. β -globin gene was PCR amplified in 26 samples and the HPV detected in 50% of the studied cases. There was no statistically significant difference between the groups in relation of clinicopathological variables and survival.

Keywords: Oropharyngeal neoplasms. Papillomaviridae. Polymerase chain reaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores	20
Tabela 2 - Correlação da presença do HPV com as variáveis clínico-patológicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe	26

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR das 26 amostras de carcinoma espinocelular de orofaringe 24
- FIGURA 2 - Probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe segundo o Grupo HPV negativo e o Grupo HPV positivo, pelo método de Kaplan & Meier 27

LISTA DE ABREVIATURAS

HPV - do inglês Human Papillomavirus

HPV+ - HPV positivo

HPV- - HPV negativo

PCR - do inglês Polymerase Chain Reaction

nPCR - do inglês nested Polymerase Chain Reaction

FOA-UNESP - Faculdade de Odontologia do Câmpus de Aracatuba - UNESP

DNA - do inglês Deoxyribonucleic Acid

rpm - rotações por minuto

dNTP - do inglês Deoxyribonucleotide Triphosphate

Tris-HCl - tris-hidroxil-metil-aminometano/ ácido clorídrico

MgCl₂ - cloreto de magnésio

pb - pares de base

EGFR - receptor de fator de crescimento epidermal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODO	18
EXTRAÇÃO DO DNA	18
PCR AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE	19
n-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADO	23
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	43

1 INTRODUÇÃO*

O câncer é um problema de saúde pública e sua etiologia é multifatorial. Quando o câncer acomete a região das vias aerodigestivas superiores, os principais fatores de risco são o fumo e o álcool,¹⁻³ porém outros fatores têm sido estudados pois a doença também acomete não fumantes e não alcoólatras. Após pesquisas apontarem a influência do HPV na carcinogênese do colo de útero,^{4,5} este vírus também começou a ser estudado como provável fator de risco do câncer das vias aerodigestivas superiores^{1,6-10} devido às semelhanças morfológicas.^{11,12}

O HPV é um DNA vírus com tropismo pelo epitélio escamoso e com mais de 120 tipos isolados.^{5,13} Os HPVs não oncogênicos como os tipos 6 e 11 induzem proliferações do epitélio como papilomas e condilomas, por outro lado os HPVs oncogênicos como os tipos 16 e 18 são associados aos carcinomas.¹⁴ Os tipos 16 e 18 são capazes de transformar células epiteliais dos tratos genital e respiratório. Essa transformação é resultado da função de duas oncoproteínas virais E6 e E7, que funcionalmente inativam o p53 e pRb, proteínas importantes de genes supressores de tumores.¹⁴⁻¹⁷

Os resultados da presença do HPV em relação ao câncer das vias aerodigestivas superiores são muito controversos,^{4,8,9,11,18-23} devido à sensibilidade e especificidade do método de detecção, quantidade e população estudadas.^{11,15,21,24}

Vários métodos têm sido estudados e empregados na detecção do HPV, tais como avaliação histopatológica, imunoistoquímica, imunoperoxidase

* Normalização segundo a revista International Journal of Cancer

hibridização *Southern blot*, *Northern blot*, *dot blot* e *in situ*, reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência e seqüenciamento de DNA.^{4,8,21,24-27} A detecção do HPV pelo método da PCR é de alta sensibilidade, pois detecta o vírus mesmo quando houver menos de uma cópia de DNA viral.^{15,28}

Em relação à localização do câncer das vias aerodigestivas superiores, a orofaringe tem sido a localização com maior prevalência de HPV,^{20,23,25,29-30} o que desperta grande interesse dos pesquisadores sobre a real participação do vírus na carcinogênese desta região.

Diferentemente das outras regiões das vias aerodigestivas superiores, o cruzamento dos dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes com câncer de orofaringe e HPV positivos têm sido estatisticamente significativos para alguns pesquisadores, sendo este grupo composto principalmente por pacientes mais jovens, que não fumam ou fumam menos, abstêmios ou que bebem menos e com tumores pobremente diferenciados.^{8, 14,31-33}

A taxa de HPV é maior nos casos de câncer de orofaringe. Mas não há evidência do sinergismo entre a exposição ao HPV e o uso do tabaco e álcool. Por esta razão, além dos efeitos carcinogênicos do tabaco e álcool, acredita-se na instabilidade genômica induzida pelo HPV.³⁴

Os dados referentes à sobrevida são muito importantes, porém controversos na medida em que alguns autores descrevem não haver relação do HPV com a sobrevida^{4,20,32} e outros afirmam haver esta relação, tornando o HPV um fator prognóstico do câncer de orofaringe.^{6,14,16,18,23,24,26,34-36}

2 PROPOSIÇÃO

Verificar a prevalência de HPV em pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe, através da técnica da reação em cadeia da polimerase, e correlacioná-la com dados demográficos, clínico-patológicos e de sobrevida.

3 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP). (Anexo A)

Este estudo baseia-se numa análise retrospectiva de 27 peças oriundas de blocos de parafina obtidos de pacientes portadores de carcinoma espinocelular de orofaringe diagnosticados e tratados no período entre Janeiro de 1991 e Dezembro de 2003, no Centro de Oncologia Bucal, Unidade Auxiliar da FOA-UNESP.

As localizações específicas dos carcinomas de orofaringe eram: 6 em palato mole, 7 em loja amigdaliana, 6 em amígdala, 4 em pilar amigdaliano, 3 em base de língua e 1 na úvula.

EXTRAÇÃO DO DNA

Dos blocos parafinados foram obtidos cortes histológicos com 10 micrômetros, de modo que o peso fosse 25mg conforme instruções do fabricante do minikit, e coletados em tubos limpos de polipropileno. Foram adicionados 1.200 microlitros (μ l) de xilol, os tubos foram agitados no vórtex durante 1 minuto e centrifugados a velocidade de 14.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido com pipeta e foram adicionados 1.200 μ l de álcool absoluto. Os tubos foram agitados no vórtex durante 1 minuto e centrifugados a velocidade de 14.000 rpm durante 5 minutos. O álcool foi removido com pipeta e os tubos permaneceram abertos durante 10 minutos na secadora à temperatura de 37° C. Realizou-se a extração do DNA com o QIAamp DNA minikit® (QUIAGEN Ltd, Alemanha) conforme instrução do fabricante.

A quantidade de DNA genômico, assim como a pureza das amostras obtidas, foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

PCR AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONTROLE

Foi realizada a PCR para o gene controle da β -globina para verificar a presença e integridade do DNA. Os componentes para PCR com volume de 20 μ l foram: 10,9 μ l de água ultrapura qsp (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 μ l de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8, e 50 mM de KCl - Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 2 μ l de $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 1,5 μ l de dNTPs (deoxyribonucleoside 5'- triphosphates – dATP, dCTP, dGTPe dTTP – Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA); 15 pmol de cada oligonucleotídeo (PCO4/GH20³⁷- Tabela 1) e 0,1 μ l de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil). Após a mistura, em outra sala de procedimentos com o auxílio do fluxo-laminar, foram adicionados 5 μ l do DNA de cada amostra totalizando um volume final de 25 μ l. Foram utilizados 2 controles positivos sendo um com sangue humano e outro com HeLa, uma linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula e o controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura.

As reações foram conduzidas em um termociclador com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de

PCR para o gene da β -globina foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Tabela- 1 Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores

Iniciador*	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	268
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	
MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG	450
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC	150
GP6+	GAAAAATAAACTTGTAATCATATTC	

* Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

n-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO HPV

Após verificar a presença e integridade do DNA, foi feita a nested PCR para HPV. Os componentes para 1ª etapa da n-PCR com volume de 20 μ l foram: 10,7 μ l de água ultrapura qsp (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 μ l de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8, e 50 mM de KCl - Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 2 μ l de $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 1,6 μ l de dNTPs (deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTPe dTTP – Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA); 1,5 μ l de cada oligonucleotídeo (MY9/MY11³⁸- tabela 1) e 0,2 μ l de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil). Após a mistura, em outra sala de procedimentos com o auxílio do fluxo-laminar, foram adicionados 5 μ l do DNA de cada amostra totalizando um volume final de 25 μ l. Utilizou-se controle positivo

com HeLa, uma linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula e controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura.

As reações foram conduzidas em um termociclador com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 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 componentes para 2ª etapa da n-PCR com volume de 23 µl foram: 13,7 µl de água ultrapura qsp (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 µl de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8, e 50 mM de KCl - Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 2 µl de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 1,6 µl de dNTPs (deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTPe dTTP – Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA); 1,5 µl de cada oligonucleotídeo (GP5+/GP6+³⁹- tabela 1) e 0,2 µl de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil). Após a mistura, em outra sala de procedimentos com o auxílio do fluxo-laminar, foram adicionados 2 µl do produto da 1ª etapa da n-PCR totalizando um volume final de 25 µl. Foram utilizados controles positivo e negativo com amostras semelhantes à primeira etapa. As reações foram conduzidas em um termociclador com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 43°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos da nPCR para HPV foram analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida a

8% que foi realizada durante 3 horas e meia, sob voltagem de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a tabulação dos dados demográficos, clínico-patológicos e de sobrevida (anexo B) obtidos nos prontuários dos pacientes, sendo que a última data de atualização dos prontuários foi Julho de 2007, em programa de computador EPI INFO 2000⁴⁰ (Center of Disease Control, Atlanta, GA, EUA).

Os pacientes deste estudo foram divididos em dois grupos. Um Grupo foi denominado de HPV positivo, e agrupa os pacientes que têm o DNA do HPV. O outro Grupo denominado HPV negativo, corresponde aos pacientes que não têm o DNA do HPV.

As variáveis demográficas, clínicas e patológicas foram analisadas em relação aos grupos através do teste exato de Fisher. Somente as médias de idades dos grupos foram analisadas através do teste t de Student. A sobrevida foi avaliada empregando-se o método de Kaplan & Meier⁴¹ e teste de Log-Rank.

4 RESULTADO

Das 27 amostras estudadas, 26 foram amplificadas para o gene β -globina humana confirmando a presença e integridade do DNA (Anexo C). Após esta etapa, utilizamos somente os 26 casos para estudar a presença do HPV. Destas, 13 (50%) apresentaram o DNA do HPV através da n-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos MY9/11 e GP5+/6+. (Fig. 1)

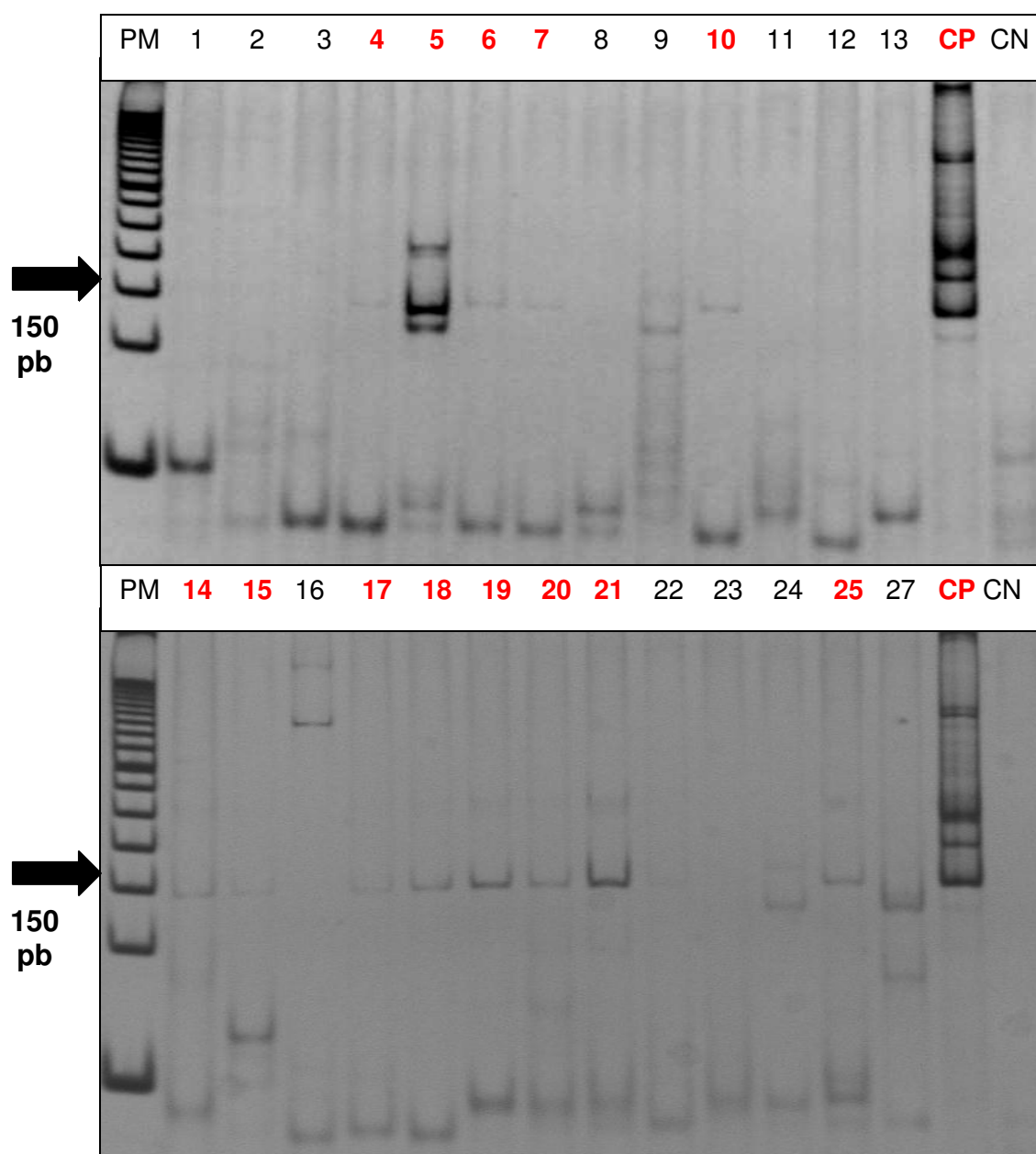


Figura- 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR das 26 amostras de carcinoma espinocelular de orofaringe

*PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de HeLa); CN = controle negativo (sem DNA)

A idade dos pacientes do Grupo HPV negativo variou de 45 a 84 anos, sendo que a média foi de 61,77 e a mediana foi de 57. A idade dos pacientes do Grupo HPV positivo variou de 42 a 85 anos, sendo que a média foi de 57,31 e a mediana foi de 59. Tanto o cruzamento entre as médias de idades dos grupos quanto o cruzamento entre as faixas etárias (idade acima ou abaixo de 50 anos) não foram estatisticamente significativos ($p=0,18$ e $p=0,5$). (Tabela 2)

Os cruzamentos entre os grupos HPV negativo e HPV positivo não foram estatisticamente significativos segundo as variáveis: sexo ($p=0,24$), raça ($p=0,5$), tabagismo ($p=0,76$), etilismo ($p=0,11$), grau histológico ($p=0,5$) e estadiamento clínico ($p=0,5$). (Tabela 2)

Tabela- 2 Correlação da presença do HPV com as variáveis clínico-patológicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe.

Variáveis		pacientes (%) n = 26	HPV + (%) n = 13	HPV - (%) n = 13	P*
Idade					0,5
	<50	5 (19,2)	3 (23,1)	2 (15,4)	
	>50	21 (80,8)	10 (76,9)	11 (84,6)	
Sexo					0,24
	Masculino	24 (92,3)	13 (100)	11 (84,6)	
	Feminino	2 (7,7)	0	2 (15,4)	
Raça					0,5
	Branca	23 (88,5)	11 (84,4)	12 (92,3)	
	Não Branca	3 (11,5)	2 (15,4)	1 (7,7)	
Tabagismo					0,76
	Tabagista	24 (92,3)	12 (92,3)	12 (92,3)	
	Não Tabagista	2 (7,7)	1 (7,7)	1 (7,7)	
Etilismo					0,11
	Etilista	23 (88,5)	13 (100)	10 (76,9)	
	Abstêmio	3 (11,5)	0	3 (23,1)	
Grau histológico⁴²					0,5
	I	9 (34,6)	4 (30,8)	5 (31,5)	
	II	17 (65,4)	9 (69,2)	8 (68,5)	
	III	0	0	0	
Estadiamento clínico⁴³					0,5
	I e II	3 (11,5)	2 (15,4)	1 (7,7)	
	III e IV	23 (88,5)	11 (84,6)	12 (92,3)	

* teste exato de Fischer

Ao final do período de acompanhamento, no Grupo HPV positivo, 12 pacientes foram a óbito devido ao câncer e 1 paciente estava vivo com a doença (7,4 anos de acompanhamento). No Grupo HPV negativo, 7 pacientes foram a óbito devido ao câncer, 2 foram a óbito devido a outras doenças e 4 estavam vivos sem a doença (10,6; 5,2; 7,8 e 3,6 anos de acompanhamento).

O teste Log-Rank que compara as curvas de probabilidade acumulada de sobrevida entre o Grupo HPV negativo e HPV positivo não apresentou significância estatística ($P = 0,15$). (Fig. 2)

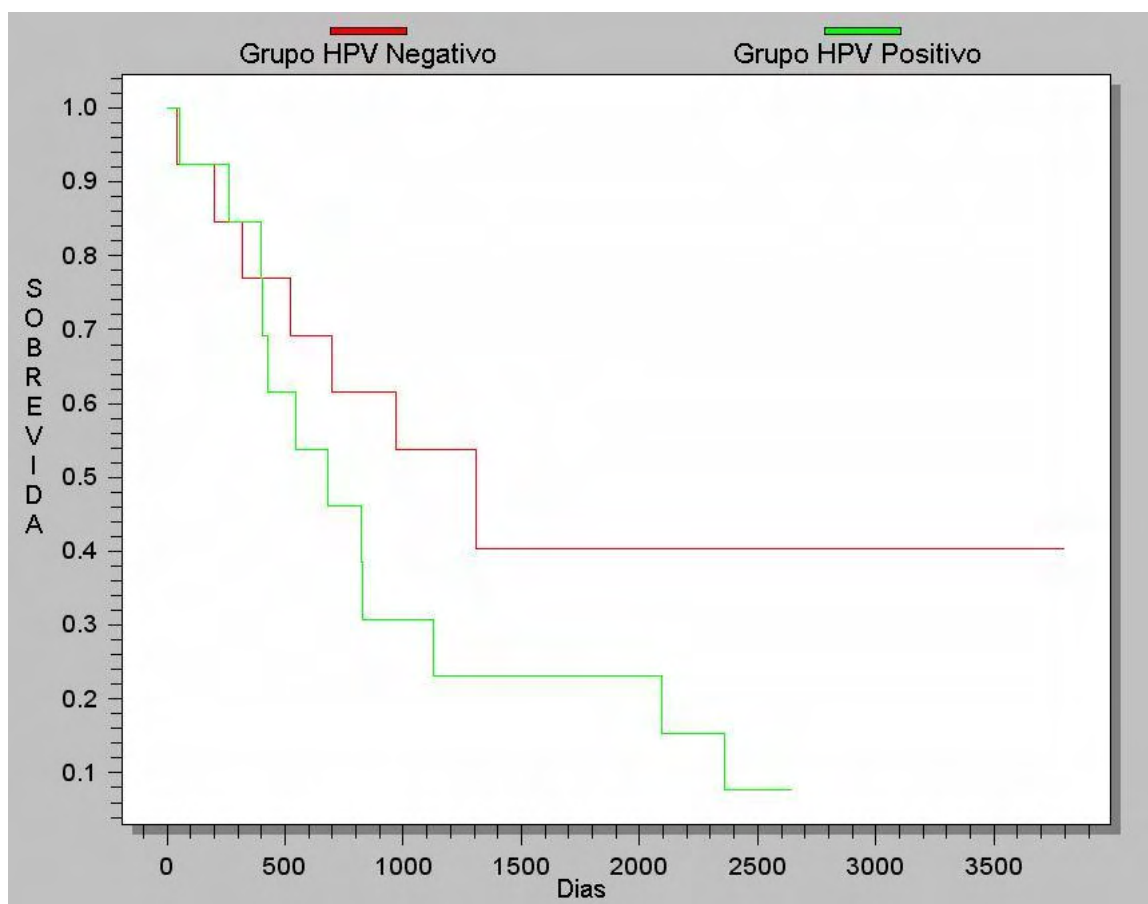


Figura- 2 Probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe segundo o Grupo HPV negativo e o Grupo HPV Positivo, pelo método de Kaplan & Meier ($P = 0.15$, Log-Rank).

DISCUSSÃO

Segundo a literatura existe grande discrepância em relação à presença do HPV no câncer de orofaringe, sendo que os índices variam de 0 a 82%. (Anexo D) Estes resultados discrepantes podem ser explicados pelas características epidemiológicas dos pacientes estudados^{9,11} e diferentes metodologias utilizadas, principalmente quanto à técnica de detecção do vírus.^{4,9,44} Neste trabalho a detecção do HPV foi feita através da nPCR pois é uma técnica de alta sensibilidade.^{9,28} Outro fator que pode explicar a amplitude da prevalência do HPV é o tipo de material utilizado, sendo que a detecção do HPV em material fresco é maior quando comparada com material parafinado (55% e 43,5% respectivamente).^{33,45} Alguns fatores podem contribuir para a falha na realização da PCR com DNA extraído de material parafinado, como a presença de substâncias inibidoras⁴⁶ e principalmente a degradação do DNA.⁴⁷ Esta pode ocorrer devido ao tempo entre a remoção cirúrgica do tecido e a fixação, tipo de fixação e duração da fixação.⁴⁷

Neste trabalho, dos 26 casos de carcinoma espinocelular de orofaringe, 13 apresentaram o HPV tendo uma prevalência de 50%, resultado que se aproxima da maioria dos relatos da literatura.^{4,6,17,23,24,25,29,32,35,48,49} Em estudo de Li et al.,¹⁸ nenhum dos 16 pacientes com carcinoma de amígdala apresentou o HPV, fato possivelmente explicado, segundo os autores, devido à baixa exposição ao vírus em algumas áreas da China que pode ser comprovada pela baixa taxa de câncer cervical e devido aos aspectos culturais quanto à atividade sexual.

Segundo Lindel et al.,²⁶ a baixa prevalência de HPV (14%) em seu estudo pode ser devido ao avançado estadiamento clínico de seus pacientes pois alguns autores como Mellin et al.³³ relatam que tumores com estadiamento clínico III e IV

são menos infectados pelo HPV. Dados deste trabalho discordam desta explicação pois, em nossa casuística tivemos 88,5% dos casos em estádios III e IV e ainda assim verificamos alta prevalência do vírus (50%).

Ernster et al.¹³ relatam que a incidência de câncer de orofaringe no sexo masculino está aumentando no Colorado (2,54 para 3,47/100.000) e nos Estados Unidos (4,34 para 4,81/100.000) e a razão referente ao número de pacientes com HPV (positivos/negativos) também aumentou, sugerindo que este aumento de incidência no câncer de orofaringe em homens pode ser causado pela oncogênese do HPV.

Em relação à localização do câncer de cabeça e pescoço, a orofaringe tem sido a localização com maior prevalência de HPV sendo especificamente a amígdala o local mais acometido pelo vírus.^{4,9,11,23,29-30} Neste estudo dos 6 pacientes com câncer de amígdala, 3 tiveram o HPV, coincidindo com a taxa geral que foi de 50%. Não está claro por que a amígdala é mais susceptível a infecção pelo HPV que outras localizações do trato aerodigestivo superior, entretanto acredita-se que há razões as quais podem facilitar a infecção neste local específico do organismo. A primeira é que a amígdala contém invaginações na sua mucosa (criptas) que podem reter agentes infecciosos simplesmente pelo seu ineficiente mecanismo de limpeza.²⁹ A segunda razão é que as criptas são compostas por uma camada de epitélio. Esse tipo de tecido pode ser mais sensível ao HPV que o epitélio estratificado escamoso.²⁹ E a última razão seria a presença de células imunologicamente competentes nesta região.^{4,17}

Além da verificação da presença do vírus nos carcinomas, seria importante analisar a forma com que o vírus está ligado às células, porém os dados ainda são controversos. Kim et al.¹² verificou que em 94,1% dos casos de carcinoma

espinocelular de amígdala com HPV, o vírus estava na forma integrada (41,2% completamente integrada e 52,9% na forma mista) e somente em 5,9%, o vírus estava na forma epissomal. Mellin et al.⁴⁵ relatam que os vírus, nos carcinomas de amígdalas, estão principalmente na forma epissomal. Outros estudos são necessários para esclarecer a atividade de transcrição do vírus.

Em relação à idade, não houve diferenças entre os Grupos HPV negativo e HPV positivo, quando a idade foi dividida em menor e maior que 50 anos e nem em relação às médias, concordando com alguns estudos^{4,16,20,29} e discordando de outros,^{6,14,31,32,48} que revelaram que o HPV foi mais associado à pacientes com menor idade. Smith et al.³¹ ainda justificam a idade considerando que o vírus é sexualmente transmitido, considerando que os pacientes mais jovens têm mais atividade sexual.

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos HPV negativo e HPV positivo, quando analisamos a variável sexo, ratificando dados de Gillison et al.,¹⁶ Báez et al.,²⁰ Strome et al.³² e Reimers et al.⁴⁴ e contradizendo estudo de Lindel et al.²⁶ e Mellin et al.³⁵ que revelaram que o grupo HPV era formado predominantemente por mulheres.

Segundo Haraf et al.⁵⁰ os cânceres com a presença do HPV são mais prevalentes na raça branca discordando de nossa pesquisa e de Gillison et al.¹⁶ que relatam não haver diferença entre os grupos segundo a raça. cremos que esta variável não tem correlação com a presença do HPV.

Alguns autores relatam que no Grupo HPV positivo, os pacientes são compostos predominantemente por não tabagistas ou que fumam menos,^{13,14,26,29,31-33,50} fato que não ocorreu em nosso trabalho, pois não houve

diferença significativa entre tabagistas e não tabagistas, assim como em outros trabalhos.^{4,16,20}

Em relação consumo de álcool, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HPV negativo e HPV positivo concordando com alguns autores^{4,16,20,32} e discordando de outros que revelam que no grupo HPV positivo há maior quantidade de pacientes não alcoólatras ou que bebem menos.^{6,14,26,29,31,33,50} Cabe ressaltar que não há padronização da quantidade de álcool nos trabalhos revisados.

Neste trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, segundo a variável grau de diferenciação histológico, o que ratifica alguns estudos^{6,13,20,26,32,50} porém discorda de outros^{4,8,12,16,17,31,44,51} que relatam que os tumores com presença do HPV são pobremente diferenciados. Ressalta-se ainda que Begum et al.,⁸ Kim et al.,¹² Gillison et al.¹⁶ e El-Mofty & Patil.⁴⁹ encontraram relação positiva entre tumores não queratinizados (basalóides) e a presença do HPV.

Segundo D'Souza et al.³⁴ não há relação entre a presença do HPV e o estadiamento clínico concordando com este estudo e também com outros^{6,13,20,29,32,44} e discordando de Paz et al.⁴ e Haraf et al.⁵⁰ que relatam que a presença do HPV é mais comum nos casos de estadiamento clínico avançado.

Quanto à sobrevida, o HPV não alterou estatisticamente a média de sobrevida, ratificando dados de alguns autores^{4,12,20,32,44} e discordando da maioria dos outros que relatam que os pacientes HPV positivos têm melhor sobrevida em relação aos pacientes HPV negativos.^{6,14,16,19,23,24,26,33,36,51} Lindel et al.²⁶ relatam que, em uma análise multivariada da sobrevida, a presença do HPV é menos importante que o tabagismo e o etilismo. Gillison et al.¹⁶ relataram que pacientes

HPV positivos têm 59% de redução em caso de morte por câncer comparado com grupo HPV negativo. Esta observação pode ter impacto sobre o futuro do tratamento destes pacientes pois protocolos podem ser criados e/ou modificados. Além da presença do HPV, a carga viral pode influenciar a sobrevida, sendo que uma quantidade maior de HPV é relacionada a uma maior sobrevida.^{16,45}

O motivo pelo qual os pacientes com carcinoma de orofaringe com HPV têm melhor sobrevida não está bem esclarecido, porém algumas razões são citadas como: uma melhor resposta a radioterapia, resposta imune a antígenos virais e uma ausência do campo de cancerização, com conseqüente diminuição de segundos tumores primários.^{14,26,33,51,52}

O câncer de orofaringe com a presença do HPV é uma entidade distinta de outros tumores de cabeça e pescoço.^{6,13,14,16,29,48} Segundo D'Souza et al.,³⁴ aqueles que praticaram sexo oral com mais de seis parceiros se revelaram 8,6 vezes mais propensos a desenvolver o câncer causado por HPV. Deste modo corroboramos com alguns autores^{3, 16,20,24,34} que ressaltam a importância de campanhas educativas e que uma racional vacinação contra o HPV pode ser feita em adolescentes com intuito de diminuir a prevalência do câncer de orofaringe.

6 CONCLUSÃO

A prevalência do HPV nos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe, neste trabalho, foi de 50% e não houve correlação estatisticamente significativa entre o HPV e as variáveis: idade, sexo, raça, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, grau de diferenciação histológico e sobrevida.

REFERÊNCIAS*

- 1- Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hipóthesis about a vírus, to concern about possible sexual transmission. Oral Oncol 2002;38:227-34.
- 2- Gillison ML Human papillomavírus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. J Clin Oncol 2006;24:5623-5.
- 3- Syrjänen S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. N Engl J Med 2007;356:1993-5.
- 4- Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. Cancer 1997; 79(3):595-604.
- 5- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002;2:342-50.
- 6- Ringström 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;8:3187-92.
- 7- Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. J Clin Pathol 2004;57:449-55.
- 8- Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar

*Normalização segundo a revista International Journal of Cancer- Anexo F

- carcinoma. Clin Cancer Res 2005;11:5694-9.
- 9- Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Andersson G. 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;125:1337-44.
 - 10-Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. Oral Dis 2005;11:350-9.
 - 11-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;14:467-75.
 - 12-Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. Int J Cancer 2007;120:1418-25.
 - 13-Ernster JA, Sciotto CG, O'brien MM, Finch JL, Robinson LJ, Willson T, Mathews M. Rising Incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic Human papillomaVirus. Laryngoscope 2007;117.in press.
 - 14-Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. J Clin Oncol. 2006;24:2606-11.
 - 15-Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral:

- revisão bibliográfica. Rev Bras Otorrinolaringol 2003;69:553-9.
- 16-Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2000;92:709-20.
- 17-Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. Am J Pathol 1998;152:145-56.
- 18-Li W, Thompson CH, Xin D, Cossart YE, O'Brien CJ, Mcneil EB, Gao K, Scolyer RA, Rose BR. Absence of human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from chinese patients. Am J Pathol 2003;163:2185-9.
- 19-Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, Mcneil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. Int J Cancer 2003;106:553-8.
- 20-Báez A, Almodovar JI, Cantor A, Cellestin F, Cruz-cruz L, Fonseca S, Trinidad-Pinedo J, Vega W. High frequency of HPV 16 associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. Head Neck 2004;26:778-84.
- 21-Tinoco JÁ, Silva AF, Oliveira CAB, Rapoport A, Fava AS, Souza RP.

Correlação da infecção viral pelo papilomavirus humano com as lesões papilomatosas e o carcinoma epidermóide de boca e orofaringe. Rev Assoc Med Bras 2004;50:252-6.

22-Xavier SD, Bussoloti FILHO I, Lancellotti CLP. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. Rev Bras Otorrinolaringol 2005;71:510-9.

23-Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. J Clin Oncol 2006;24:736-47.

24-Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. Lancet 2004;363:1488-9.

25-Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, Daniel R, Shah KV, Sidransky D. 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;6:4171-5.

26-Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. Cancer 2001;92:805-13.

- 27-Do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, Pereira Sobrinho JS, de Souza FP, Villa LL, Rahal P. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J Med Virol.* 2006;78:614-8
- 28-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;91:622-35.
- 29-Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92:2875-84.
- 30-Kreimer AR, Clifford GM, Snijders PJF, Castellsague X, Meijer CJ, Pawlita M, Viscidi R, Herrero R, Franceschi S. HPV16 semiquantitative viral load and serologic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;115:329-32.
- 31-Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-72.
- 32-Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL. Squamous cell

- carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. Clin Cancer Res 2002;8(4):1093-100.
- 33-Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. Int J Cancer 2000;89(3):300-4.
- 34-D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med 2007;356:1944-56.
- 35-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;23:2821-8.
- 36-Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx Int J Cancer 2003;104:336-44.
- 37-Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1993;85:1159-64.
- 38-Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AI, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human

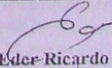
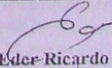
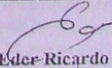
- papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209–14.
- 39-De Roda Husman AM, Walboomers JM, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
- 40-EPI INFO 2000. Versão 3.1 [arquivo de programa]. Atlanta: Center of disease control; 2003.
- 41-Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
- 42-World Health Organization. International classification of diseases for oncology. Geneva: World Health Organization; 1988.
- 43-UICC (UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER). TNM: classificação dos tumores malignos. 6.ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. 2004. 254p.
- 44-Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer *Int J Cancer* 2007;120:1731-8.
- 45-Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-8.

- 46-An SF, Fleming KA. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol* 1991;44:924-7.
- 47-Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:118-26.
- 48-Li W, Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Rose BR. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck* 2004;26:1-9.
- 49-El-Mofty SK, Patil S. Human papillomavirus (HPV)- related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:339-45.
- 50-Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2:755-62.
- 51-Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 1998;58:5-13.

52-Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma J Clin Oncol 2006;24:5630-6.

ANEXOS

Anexo A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba							
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-		<table border="1"><tr><td>FLC.</td><td>78</td></tr><tr><td>PRO.</td><td>206-01177</td></tr><tr><td>RUB.</td><td>Bri</td></tr></table>	FLC.	78	PRO.	206-01177	RUB.	Bri
FLC.	78							
PRO.	206-01177							
RUB.	Bri							
OF. 112/2006 CEP SFCD/bri	Araçatuba, 11 de agosto de 2006.							
Referência Processo FOA 2006-01177								
O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto "DETECÇÃO DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO(HPV) EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE(PCR).CORRELAÇÃO COM DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, ANÁTOMO-PATOLÓGICOS, TERAPÊUTICOS E DE SOBREVIDA" expede o seguinte parecer:								
Aprovado:								
Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatório parcial em 10/08/2007 e o relatório final em 10/08/2008.								
Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon Coordenador do CEP								
Ilmo. Senhor Dr.EDER RICARDO BIASOLI Araçatuba-SP-	<table border="1"><tr><td>Ciente.De acordo.</td></tr><tr><td>22/08/2006</td></tr><tr><td></td></tr><tr><td>Dr.Eder-Ricardo Biasoli</td></tr></table>		Ciente.De acordo.	22/08/2006		Dr.Eder-Ricardo Biasoli		
Ciente.De acordo.								
22/08/2006								
								
Dr.Eder-Ricardo Biasoli								

Anexo C- Figura

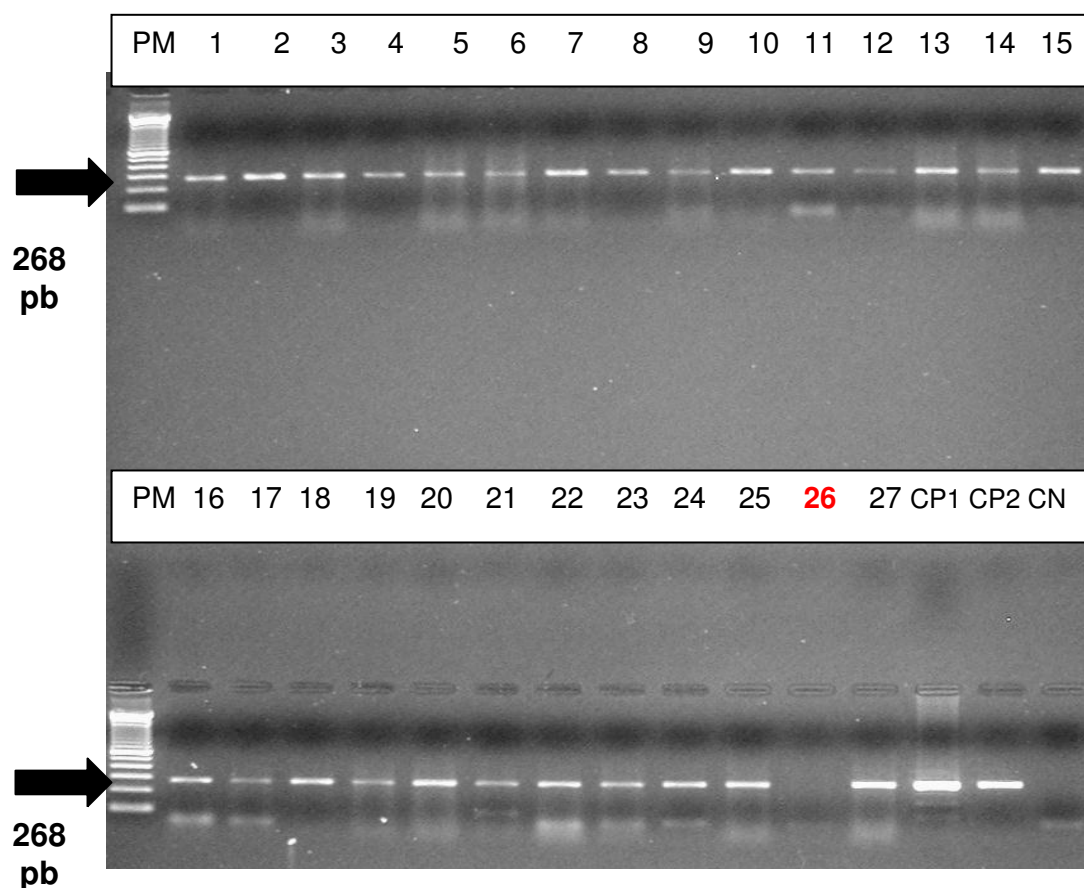


Figura Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da betaglobina (268 pb) por PCR das 27 amostras de carcinoma espinocelular de orofaringe

*PM = peso molecular de 100 pb; CP1 = controle positivo (DNA extraído de sangue humano); CP2 = controle positivo (DNA extraído de HeLa); CN = controle negativo (sem DNA)

Anexo D- Tabela

Tabela - Prevalência do HPV em estudos com câncer de orofaringe e amígdala.

Estudo	localização	Método de detecção	Tipo de Material	HPV positivo	%
Haraf et al. 1996	orofaringe	PCR	parafinado	10/26	38
Paz et al. 1997	loja amigdaliana	PCR	tecido fresco	9/15	60
Wilczynski et al. 1998	amígdala	PCR,SB e HIS*	tecido fresco e parafinado	14/22	64
Capone et al. 2000	orofaringe	PCR e HIS	tecido fresco e parafinado	9/17	53
Gillison et al. 2000	orofaringe	PCR,SB e HIS	tecido fresco	34/60	56
Mellin et al. 2000	amígdala	PCR	parafinado	26/60	43
Klussmann et al. 2001	orofaringe	nPCR	tecido fresco	15/33	45
Lindel et al. 2001	orofaringe	PCR	parafinado	14/99	14
Mellin et al. 2002	amígdala	PCR	tecido fresco	11/22	55
Ringstrom et al. 2002	orofaringe	PCR	tecido fresco	15/29	52
Strome et al. 2002	amígdala	PCR e nPCR	parafinado	24/52	46
Li et al. 2003	amígdala	PCR	parafinado	31/67	46
Li et al. 2003	amígdala	PCR e nPCR	parafinado	0/16	0
Mellin et al. 2003	amígdala	PCR	parafinado	27/60	45
Ritchie et al. 2003	orofaringe	PCR	parafinado	19/45	42
Báez et al. 2004	orofaringe	PCR	tecido fresco	10/16	62
Li et al. 2004	amígdala	PCR e nPCR	parafinado	21/50	42
Smith et al. 2004	orofaringe	PCR	parafinado	25/67	37
Begum et al. 2005	orofaringe	HIS	parafinado	37/45	82
Hansson et al. 2005	orofaringe	nPCR	células exfoliadas	25/46	54
Kreimer et al. 2005	orofaringe	PCR	parafinado, tecido fresco e células exfoliadas	345/969	35
Kreimer et al. 2005	orofaringe	PCR	tecido fresco	25/116	21
El-Mofty et al. 2006	orofaringe	PCR	parafinado	12/20	60
Licitra et al. 2006	orofaringe	Real time PCR	parafinado	17/90	19
Weinberger et al. 2006	orofaringe	Real time PCR	parafinado	48/ 79	61
D'Souza et al. 2007	orofaringe	HIS	parafinado	72/100	72
Kim et al. 2007	amígdala	Real time PCR	parafinado	38/52	73
Reimers et al. 2007	orofaringe	nPCR	tecido fresco	30/106	28

*SB- hibridização *Southern Blot*; HIS- hibridização *in situ*

Anexo E- Revisão de literatura

Revisão de literatura

Haraf et al. (1996) estudaram a relação entre o p53 e o HPV em 66 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Vinte e quatro por cento dos pacientes tiveram mutações no p53 e 18% foram HPV positivos. Somente 1 paciente foi positivo para ambas as variáveis. O câncer de amígdala foi associado ao HPV e inversamente relacionado ao tabagismo e etilismo. O HPV pode ser relacionado ao câncer em pacientes sem os tradicionais fatores de risco.

Paz et al. (1997) avaliaram a presença do HPV em 167 tumores de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e esôfago através da PCR, com tecido fresco. O vírus foi encontrado em 15% dos 167 tumores sendo: 9/15 nos casos de loja amigdaliana, 5/39 nos casos de língua, 2/15 nos casos de assoalho de boca, 0/11 nos casos de esôfago e 0/7 nos casos de faringe entre outros. Não houve relação entre o HPV e o sexo, idade, tabagismo e etilismo. O HPV foi associado a tumores com estadiamento clínico avançado porém sem alteração na sobrevida.

Andl et al. (1998) realizaram estudo com 208 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e analisaram a presença do pRb. Destes, 23 tumores (11%) que estavam localizados nas amígdalas mostraram ausência ou grande redução do pRb. O HPV foi relacionado com a etiologia dos tumores sugerindo uma funcional inativação do pRb pelo gene E7.

Wilczynski et al. (1998) estudaram 22 pacientes com carcinoma espinocelular de amígdala. A presença do HPV foi analisada através da PCR

utilizando os oligonucleotídeos MY09/MY11. Os tumores foram classificados em bem queratinizados, moderadamente queratinizados e pobremente queratinizados. O HPV foi detectado em 14 (64%) casos, sendo 11 do tipo 16, 1 do tipo 33, 1 do tipo 59 e 1 caso sem classificação. O vírus acometeu principalmente os tumores classificados como pobremente queratinizados (10 casos).

Capone et al. (2000) avaliaram a presença do HPV em 70 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. A detecção foi realizada em tecidos tumorais frescos e no sangue através da PCR, *dot blot* hibridização, *southern blot* hibridização e hibridização *in situ*. Combinando a PCR com hibridização *in situ* 9/17 (53%) dos tumores de orofaringe, 3/10 (30%) tumores de boca, 2/17 (12%) tumores de laringe e 1/4 (25%) de hipofaringe foram HPV positivos. Destes 13 que foram positivos para L1 e E7, 85% tinham lesões avançadas (estadiamento clínico III e IV). Das amostras de sangue apenas 11/66 (17%) foram positivas para o HPV. De 13 amostras positivas para HPV no tecido fresco, 6 também foram positivas para análise do sangue e apresentavam estadiamento clínico avançado sendo que 4 desenvolveram metástase à distância. A presença do HPV no sangue de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço HPV positivos pode servir como um marcador para metástase.

Gillison et al. (2000) estudaram 253 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Foi verificada a presença do HPV através da PCR, *Southern Blot* hibridização e hibridização *in situ*. O vírus foi identificado em 62 (25%) dos casos sendo 10 (16%) em boca, 34 (55%) em orofaringe, 2 (3%) em hipofaringe e 16 (26%) em laringe. O tipo 16 esteve presente em 90%. O câncer

de orofaringe HPV positivo ocorre menos comumente nos mais alcoólatras e nos tabagistas. É relacionado com o tipo histológico basalóide, menos associado a mutações no TP53 e tem maior sobrevida. O câncer de orofaringe HPV positivo é uma doença clínico e patologicamente distinta e com melhor prognóstico.

Mellin et al. (2000) realizaram estudo com o objetivo de investigar a frequência do HPV em cânceres de amígdala e correlacionar sua presença com fatores clínico-patológicos e de sobrevida. O HPV foi analisado através da PCR em 60 biópsias de carcinomas. Todos os pacientes foram tratados através da radioterapia (45% exclusivamente e 55% associada à cirurgia). O HPV 16 foi detectado em 26 casos (43%). A taxa de sobrevida, aos 5 anos, foi de 53,5% para os pacientes HPV positivos e de 31,5% para os pacientes HPV negativos. Concluíram que a presença do HPV é um fator prognóstico favorável no câncer de amígdala e pode ser usado como marcador para otimizar o tratamento.

Klussmann et al. (2001) avaliaram 98 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço através da nPCR. Encontraram 26% de prevalência sendo que a orofaringe foi a localização com maior porcentagem (45%). Relatam especial atenção as amígdalas que tiveram 58% de amostras com positividade para o vírus. No carcinoma de amígdala, a presença do HPV teve correlação estatisticamente significativa com o menor consumo de álcool, tabaco e tumores indiferenciados. Concluíram que os carcinomas de amígdala HPV positivos e HPV negativos são entidades diferentes e que os convencionais fatores de risco são menos importantes nos casos positivos.

Lindel et al. (2001) estudaram tecidos parafinados de 99 pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe através da PCR. O vírus foi encontrado em 14 peças sendo 11 do tipo 16, 1 do tipo 33, 1 do tipo 35 e 1 do tipo 45. Esta baixa

prevalência de HPV (14%) pode ser devido ao avançado estadiamento clínico de seus pacientes pois alguns autores relatam que tumores com estadiamento clínico III e IV são menos infectados pelo HPV. O grupo HPV positivo foi composto principalmente por mulheres, com idade maior que 56 anos, não fumantes e não alcoólatras e com melhor sobrevida.

Miller & Johnstone (2001) em meta-análise de 1982-1997 avaliaram 4680 amostras de tecido fresco e parafinado sendo que observaram o HPV em 10% dos casos de mucosa normal, 22,2% nos casos de leucoplasia, 26,2% em casos de carcinoma in situ e 46,5% nos casos de carcinoma espinocelular. Concluíram que o HPV é um fator de risco independente e de suma importância no carcinoma, sendo que os seus resultados indicam que a detecção do HPV é duas a três vezes mais comum em lesões pré-malignas e 4,7 vezes mais comum em carcinoma espinocelular, quando comparado com a mucosa oral normal.

Mellin et al. (2002) analisaram a presença do HPV em tecido fresco de 22 cânceres de amígdala. O vírus foi detectado em 12 (55%) dos casos. Avaliaram também a carga viral do HPV e verificaram que aqueles que apresentavam 190 ou mais cópias de HPV 16/beta-actina tiveram melhor sobrevida do que aqueles que apresentavam 60 cópias ou menos de HPV 16/beta-actina e que o vírus apresentava-se principalmente na forma episomal.

Ringström et al. (2002) estudaram 89 carcinomas de cabeça e pescoço sendo que a maioria era localizada na cavidade oral, seguida da orofaringe. Através da PCR detectaram que 20% das amostras eram HPV 16 positivas (52% na orofaringe e 5% na cavidade oral). Caracterizaram o grupo HPV positivo como tendo menor idade, que consumiam menos quantidade de álcool e com melhor sobrevida tendo então um processo de doença distinto.

Strome et al. (2002) utilizaram a PCR para identificar o HPV em tecidos de amígdala e linfonodos de 52 pacientes com carcinoma espinocelular de amígdala. O resultado foi relacionado com dados clínicos. O HPV foi identificado em 46% dos pacientes e o seqüenciamento mostrou que 40% eram do tipo 16. Quinze de 16 pacientes com o HPV com metástase regional mostravam evidência do vírus nos linfonodos em análise histopatológica. Dezesete de 23 linfonodos negativos para o HPV pela histologia, mostravam positivos pela PCR. Concluíram que o HPV é um fator de risco independente no carcinoma de amígdala e que a presença do vírus em linfonodos, histologicamente positivos e negativos de pacientes com tumores HPV positivos, suporta que o HPV participa na oncogênese do carcinoma de amígdala.

Li et al.¹⁸ (2003) não detectaram a presença do HPV em tecidos parafinados de 16 pacientes com carcinoma espinocelular de amígdala. Justificam esse fato devido à baixa exposição ao vírus em algumas áreas da China, que pode ser comprovada pela baixa taxa de câncer cervical e devido a fatores culturais em relação ao sexo oral. Estudaram também a expressão de marcadores do ciclo celular através da imunoistoquímica. Relatam que assim como estudo semelhante realizado na Austrália, os carcinomas HPV negativos foram super-expressados para pRb e ciclina e pouco expressados para o p16.

Li et al.¹⁹ (2003) estudaram 86 pacientes com câncer de amígdala e verificaram a prevalência do HPV através da PCR. Também realizaram imunoistoquímica para marcadores do ciclo celular. A presença do HPV pôde ser analisada em 67 tumores, sendo que o vírus foi encontrado em 31 (46%) tumores. O tipo 16 foi predominante. Nenhum dos marcadores do ciclo celular (p53, p21, pRb, p16, ciclina D1 e p27) teve relação com recidiva e sobrevida. Concluíram

relatando que o câncer de amígdala HPV positivo pode ter um comportamento biológico distinto e com características menos agressivas. O HPV pode otimizar o tratamento e ter valor prognóstico.

Mellin et al. (2003) detectaram o HPV em 27(45%) pacientes com carcinoma de amígdala que foram tratados com radioterapia, através da PCR com oligonucleotídeos GP5+/6+ sendo que todos os tumores apresentavam o tipo 16. Os pacientes HPV positivos tiveram maior sobrevida do que os negativos.

Oliveira et al. (2003) realizaram revisão de literatura sobre o HPV e a carcinogênese oral e concluíram que: Fica patente que a participação do HPV na carcinogênese oral está associada a uma parte dos carcinomas orais e que a sua ação nesse processo é sinérgica, ou seja, está associada a outros carcinógenos químicos e físicos de grande importância, como o fumo e o álcool. Apenas uma reduzida porcentagem de carcinomas orais estaria associada exclusivamente à ação das proteínas virais E5, E6 e E7, sem qualquer participação efetiva dos anteriormente citados carcinógenos químicos e físicos.

Ritchie et al. (2003) avaliaram a presença do HPV através da PCR e seqüenciamento de 139 pacientes com carcinomas de boca e de orofaringe. O vírus foi encontrado em 21% dos tumores sendo 83% do tipo 16. Risco para o HPV foi associado ao sexo masculino, com história de sexo oro-genital e com a orofaringe. Os pacientes HPV positivos tiveram maior sobrevida que os HPV negativos. O HPV foi identificado com um fator prognóstico no câncer de boca e orofaringe.

Báez et al. (2004) analisaram 118 pacientes em Porto Rico com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Em 52 pacientes (44%) foi observada a presença do HPV 16. Na orofaringe, 10/16 casos foram positivos para o vírus.

Não houve relação entre o HPV e o grau histológico do tumor, estadiamento clínico, tabagismo, etilismo e sobrevida.

Gillison & Lowy (2004), após breve revisão, relatam que a afirmação de que prevalência do HPV varia de acordo com a área geográfica, provavelmente depende da prevalência do tabagismo e etilismo, assim como o comportamento sexual associado ao vírus. Relatam também a possibilidade da vacina contra o HPV diminuir a incidência do câncer de cabeça e pescoço.

Li et al. (2004) estudaram 50 carcinomas espinocelulares de amígdala e analisaram a presença do HPV através da PCR e a expressão das proteínas do ciclo celular (p53, pRb, p16, p21, p27 e ciclina D1). Como resultado tiveram que o HPV estava presente em 42% das amostras sendo quase todas do tipo 16. Houve significância estatística entre os HPV positivos e a reduzida expressão do pRb e ciclina D1 e super-expressão da p16 e paciente jovens, sugerindo que tumores HPV positivos são distintos dos HPV negativos.

Smith et al. (2004) estudaram a presença do HPV em 193 pacientes com câncer de boca e de orofaringe através da PCR e seqüenciamento com amostras parafinadas e células exfoliadas da mucosa bucal. Também foi realizado um questionário com informações sobre fatores de risco, práticas sexuais e história médica. A prevalência do HPV foi de 20% no geral e 37% nos casos de orofaringe. Pacientes jovens e que tinham mais parceiros sexuais foram considerados fatores de risco para o HPV. Concluíram que a prevalência do HPV é alta em jovens com câncer de boca e orofaringe que têm vida sexual tipicamente associada à transmissão do vírus. Concluíram, também que o teste positivo para o HPV com células exfoliadas da boca é um fator predictivo para o câncer.

Syrjänen (2004) realizou revisão de literatura e verificou que até o fim do ano de 2000, 432 cânceres de amígdala foram analisados para avaliar a presença do HPV. A média de detecção foi de 51% com o tipo 16 sendo o mais prevalente (84%). O número de cópias de HPV é similar ao encontrado nos carcinomas genitais (10-300 cópias/célula), embora o vírus esteja principalmente na forma episomal. Relata a não clareza desses dados. Os pacientes com HPV são mais jovens, têm melhor sobrevida e que a associação com tradicionais fatores de risco como tabagismo e etilismo é menos freqüente que nos pacientes HPV negativos.

Tinoco et al., (2004) estudaram retrospectivamente 66 lâminas e blocos de parafina com tecido biopsiado e fixado com formalina com o diagnóstico de carcinoma espinocelular em 38 casos, de hiperplasia epitelial papilomatosa em 20 casos e de papilomas em oito casos. Foi utilizado a imunoistoquímica para analisar este material e determinar a possível presença do DNA viral nas amostras citadas. A presença do DNA viral (HPV) foi detectada em 16 dos 38 casos de carcinoma (42,5%), 19 em 20 casos de hiperplasia (95%) e em todos os oito casos de papilomas (100%). Concluíram que as lesões papilomatosas e hiperplásicas da boca e orofaringe estão associadas ao HPV, ao contrário do carcinoma espinocelular que não apresentou correlação estatística significativa com este agente infeccioso.

Begum et al. (2005) detectaram a presença do HPV através da hibridização *in situ* em 38/172 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço sendo que em 37/45 o tumor estava localizado na orofaringe. Quanto à imunoistoquímica, 82% dos casos HPV positivos exibiam forte e difusa marcação para o p16 enquanto que somente 8% dos casos HPV negativos mostravam essa marcação. Também realizaram comparação entre 8 amígdalas com carcinoma, 8 amígdalas sem

carcinomas (contralaterais das com carcinoma) e 8 amígdalas controle. Verificaram a presença de displasia em 8 amígdalas com carcinoma, 1 contralateral e nenhuma no grupo controle. O vírus não foi encontrado no epitélio normal. Relatam que o vírus estava na forma integrada.

Hansson et al. (2005) realizaram estudo com 131 pacientes com câncer de boca e orofaringe e 320 pacientes controles. Foram coletadas amostras através de swabs no tumor, na loja amigdaliana e com bochechos e realizado a nPCR com oligonucleotídeos MY9/11 e GP5+/6+ para o HPV. As amostras positivas foram seqüenciadas. Dos 46 tumores de orofaringe 25 foram positivos para HPV de alto risco e 2 para baixo risco. Dos casos controles somente 3/320 foram positivos para HPV de alta risco e 13 para baixo risco.

Kreimer et al.¹¹ (2005) realizaram meta-análise de estudos com biópsias de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço que foram avaliados através da PCR para avaliar prevalência do HPV, tipo e distribuição anatômica. De 5.046 carcinomas referente a 60 estudos, o HPV teve média de 25,9% de prevalência sendo maior em orofaringe (35,6%) do que em boca (23,5%) e laringe (24%). O tipo 16 foi a maioria dos HPVs de orofaringe (86,7%). Relataram que os estudos da América do Norte mostraram maior prevalência do câncer de orofaringe que da Europa (47% e 28,2% respectivamente).

Kreimer et al.³⁰ (2005) realizaram estudo multicêntrico com 908 casos de câncer de boca e orofaringe. Após os critérios de exclusão, as amostras constavam de 53 pacientes com câncer de boca e 25 com câncer de orofaringe, ambos com o vírus. Foi realizada a análise da carga viral e a presença de anticorpos para o HPV no sangue. Três grupos foram formados sendo o primeiro formado por pacientes HPV negativo, o segundo formado por HPV positivo com

baixa carga viral e o terceiro formado por HPV positivo com alta carga viral. Os anticorpos sorológicos foram detectados em 9,7% no primeiro grupo, 22,2% no segundo e 60% no terceiro. Os casos de HPV-16 positivos com baixa carga viral foram mais freqüentes nos casos de orofaringe. Concluem que, como parece existir forte relação da carga viral com a presença de anticorpos sorológicos, na falta destes, a carga viral pode ajudar a delinear o tipo distinto de câncer de boca e orofaringe HPV positivos.

Xavier et al. (2005) realizaram estudo com objetivo de verificar a prevalência de achados sugestivos de HPV - coilocitose - em carcinoma espinocelular oral e de orofaringe. Foram examinadas no microscópio 20 lâminas, sendo que como resultado, a coilocitose foi encontrada em 15 lâminas, correspondendo a 75% das amostras e em 4/4 amostras de orofaringe (100%). Não foi observada menor associação com álcool e tabaco.

El-Mofly & Patil (2006) comparam a presença do HPV em dois grupos de carcinoma de orofaringe sendo que o primeiro grupo era formado por lesões descritas como não queratinizadas e o segundo grupo era formado por lesões classicamente queratinizadas. O HPV 16 foi encontrado em 10 (100%) das lesões não queratinizadas e somente em 2 (20%) dos carcinomas clássicos. Também definiram padrões imunoistoquímicos. As lesões não queratinizadas foram fortemente reativas para o p16 e Ki67 e pouco para o p53. As lesões queratinizadas foram pouco e focalmente reativas para o p16, pouco expressadas para o Ki67 e tiveram alta expressão pelo p53 comparadas com o outro grupo.

Gillison (2006) relata que associação entre o status do HPV nos tumores e o prognóstico é, atualmente, forte e consistente e que seu impacto nas pesquisas clínicas envolvendo pacientes com câncer de cabeça e pescoço deva ser

considerado. Sugere estudos prospectivos utilizando um local específico e avaliação imunoistoquímica com o p16.

Fakhry & Gillison (2006) realizaram extensa revisão de literatura, relatando que o HPV é reconhecido por participar na patogênese de um tipo distinto de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, particularmente àqueles que acometem as amígdalas. O tipo 16 é o mais identificado nos tumores HPV positivos. O HPV pode estar alterando os dados demográficos dos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, com tendência a pacientes mais jovens, não tabagistas e não etilistas. A presença do HPV é um fator prognóstico, sendo que os pacientes com o vírus têm a metade de chance de morte pelo câncer de cabeça e pescoço quando comparado aos pacientes sem o vírus.

Licitra et al. (2006) detectaram HPV tipo 16 em 17 (19%) de 90 cânceres de orofaringe e relataram evidência de integração viral no genoma das células tumorais. Também mostraram que a presença do HPV é inversamente associada com uma funcional inativação do p53 pela oncoproteína E6 do HPV. Cânceres de orofaringe HPV positivos têm aproximadamente 60% de redução na mortalidade em 5 anos comparados aos HPV negativos.

Weinberger et al. (2006) estudaram a presença do HPV através da PCR em 79 carcinomas de orofaringe. Avaliaram também a expressão do p53, p16 e Rb. Os tumores foram classificados em 3 classes com base na expressão do p16 e do HPV sendo: classe I HPV negativos e p16 pouco expressado, classe II HPV positivos e p16 pouco expressado e classe III HPV positivos e p16 altamente expressado. Sessenta e um por cento dos tumores foram HPV positivos e tiveram melhor sobrevida comparados aos HPV negativos. Os tumores da classe III

tiveram melhora na sobrevida (79%) comparados com as duas outras classes (20 e 18%).

D'Souza et al. (2007) realizaram estudo caso-controle com 100 pacientes diagnosticados com câncer de orofaringe e 200 pessoas saudáveis. Foi feita a detecção do HPV em tecidos tumorais parafinados e células exfoliadas da boca. Também foi feito o exame sorológicos destes pacientes para examinar a presença de anticorpos contra o HPV. Foi realizado o cruzamento entre os dados do HPV e dados de questionário respondido pelos pacientes. Como resultado, o HPV 16 foi detectado em 72% dos tumores através da hibridização *in situ*. Não houve relação de sinergismo entre o HPV e uso de tabaco e álcool sugerindo 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. Os pacientes cujas amostras de sangue ou saliva indicaram infecção anterior por HIV se revelaram mais propensos a desenvolver o câncer de orofaringe. Aqueles que praticaram sexo oral com mais de seis parceiros se revelaram 8,6 vezes mais propensos a desenvolver câncer causado por HPV. Em pacientes soropositivos para o HPV 16, as taxas de câncer de orofaringe não aumentam entre os mais fumantes e alcoólatras. Entretanto quando os pacientes são soronegativos, a taxa de câncer de orofaringe aumenta entre os mais fumantes e alcoólatras.

Ernster et al. (2007) avaliaram 72 casos de câncer de orofaringe através da PCR e encontraram o HPV 16 em 50 (69%). Também realizaram estudo epidemiológico através do Colorado Central Cancer Register (CCCR) e do Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) que mostrou que a

incidência de câncer de orofaringe em homens no Colorado aumentou de 2,54 para 3,47/100.000 enquanto a taxa aumentou de 4,34 para 4,81/100.000 nos Estados Unidos. A razão HPV positivo/negativo foi de 0,72 (8/11) antes de 1995 e de 3,81 (42/11) após este período. A sobrevida melhorou no grupo com a presença do HPV.

Kim et al. (2007) estudaram 52 pacientes com carcinoma espinocelular de amígdala e 61 pacientes com tonsilite como grupo controle. A prevalência do HPV foi de 73,1% nos casos de carcinoma sendo 87,2% do tipo 16 e 11,6% nos casos de tonsilite sendo 37,5% do tipo 16. Nos casos de tonsilite foram encontrados, também, os tipos 6,11 e 84 que são de baixo risco. Nos casos de carcinomas o HPV estava presente na forma epissomal em 2/34 casos (5,9%), na forma integrada em 14/34 casos (41,2%) e na forma epissomal e integrada (mista) em 18/34 casos (52,9%). Nos casos de tonsilite, os 3 exemplos examinados (100%) apresentavam os vírus estavam na forma epissomal. Comparando-se os tumores HPV positivos com negativos, os positivos foram fortemente relacionados com a super-expressão do p16 e baixa expressão para o EGFR. Não houve diferença na sobrevida dos pacientes em relação à presença do HPV.

Reimers et al. (2007) verificaram a presença do HPV, a expressão do p16 e EGFR em 106 carcinomas espinocelulares de orofaringe. O vírus foi identificado em 30 (28%) dos casos sendo 29 do tipo 16 e 1 do tipo 33. Quanto ao p16, 29/96 amostras foram consideradas positivas e quanto ao EGFR, 10/29 foram consideradas positivas. Houve correlação significativa entre o p16 e o HPV (HPV positivos e p16 positivos) e tendência a relação inversa entre p16 e EGFR (p16 positivo, EGFR negativo). A correlação entre o HPV e o EGFR não foi

estatisticamente significativa. A presença do HPV aumentou a média de sobrevida porém não foi estatisticamente significativo. A superexpressão do p16 aumentou estatisticamente a média de sobrevida e expressão do EGFR não alterou estatisticamente a sobrevida dos pacientes.

Syrjänen (2007) em editorial de revista em 2007, relata que mais pesquisas são necessárias para saber se o tabagismo é um fator independente ou componente sinérgico do mecanismo do HPV associado ao carcinoma de boca e orofaringe. Afirma também que a associação entre alguns casos de câncer de orofaringe e a infecção pelo HPV parece firmemente estabelecida e que deve-se considerar que cânceres de boca, orofaringe e laringe possam ser prevenidos pela vacina contra o HPV.

Anexo F- Normas da Revista International Journal of Cancer

International Journal of Cancer

For Authors

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley InterScience journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Manuscript Submission Form](#)
- [Copyright Transfer Agreement](#)
- [Permission Request Form](#)
- [Wiley's Journal Styles and EndNote](#)
- [The National Institutes of Health Public Access Initiative](#)

Instructions to Authors

Online Submission and Peer Review

The **International Journal of Cancer** (official journal of the International Union Against Cancer—UICC) appears 24 times per year. **International Journal of Cancer** invites submission of manuscripts under a broad scope of topics relevant to experimental and clinical cancer research and publishes original research articles, mini reviews, forum papers, short reports, and letters to the editor. The article categories within the journal are: carcinogenesis, cancer cell biology, cancer genetics, infectious causes of cancer, tumor immunology, early detection and diagnosis, epidemiology, and cancer therapy.

SCOPE

Types of articles

Research Articles

- [Carcinogenesis](#)
- [Cancer Cell Biology](#)
- [Cancer Genetics](#)
- [Infectious Causes of Cancer](#)
- [Tumor Immunology](#)
- [Early Detection and Diagnosis](#)
- [Epidemiology](#)
- [Cancer Therapy](#)

Mini Reviews

Letters to the Editor

Short Reports

PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

Research Articles

Mini Reviews

Letters to the Editor

[Short Reports](#)[General Elements of Manuscripts](#)[Sponsorship and Funding/Financial Disclosure](#)[Gene Names](#)[References](#)[Figures](#)[Electronic Supplementary Material](#)**[EDITORIAL PROCESS](#)****[SUBMISSION PROCEDURE](#)**[New Submissions](#)[Required Documents for New Manuscripts](#)[Submission of Revised Manuscripts](#)**[EDITORIAL DECISIONS](#)**[Rejected Papers](#)[Revisions Requested](#)[Accepted Papers](#)**[PUBLICATION AND TECHNICAL INFORMATION](#)**[Guidelines for Final Version of Accepted Papers](#)[Text](#)[Figures](#)[Charges](#)[Page charges](#)[Color charges](#)**[CONTACT INFORMATION](#)****Types of Articles****Research Articles**

Full research papers should be as concise as possible, without sacrificing documentation of results. For studies on humans, a clear statement must be provided concerning informed consent, and that the study was conducted after Human Experimentation Review by the relevant committee. Research articles should fit within the categories outlined below and meet the editorial standards stated.

The journal is pleased to offer a fast publication track for research articles presenting superior novel findings and for studies of greatest priority ranked against similar submissions. The “Fast Track” articles appear earlier than regular papers. Fast Track papers are chosen specifically by the editors according to their judgment and upon the recommendation of reviewers. [Presentation of research articles](#)

Carcinogenesis

Carcinogenesis includes studies on physical and chemical carcinogens, metabolism, repair of carcinogen-modified DNA, molecular dosimetry, the formation, identification and quantification of carcinogens from exogenous and endogenous sources. Reports on mechanistic investigations are particularly welcome and can include both animal and human studies. The cancer-preventive potential of chemical, physical, or biological reagents also fits into this section.

[Return to Top](#)

Cancer Cell Biology

Analytical and functional data on tumor cell characterization (in vitro and in vivo) and on tumor-stroma interactions are very welcome. Immunohistochemical studies on tumor specimens should comprise reliable characterization of the immune reaction with proof of antibody specificity and selectivity. These data should be seconded by RNA expression and/or functional studies demonstrating the reliability and relevance of the histochemical findings. Confirmatory findings on additional tumor types, stages, or sites without new functional, diagnostic, or therapeutic implications are not within the scope of the journal.

[Return to Top](#)

Cancer Genetics

Genetic studies leading to the identification of factors and biochemical pathways relevant for the pathomechanism of tumors are particularly welcome. For studies concerning polymorphisms and cancer risk, a clear explanation of the biological hypothesis underlying the investigation, including possible biochemical pathways and functional relevance of genetic polymorphisms should be given. In cases of newly identified alleles, the potential functional relevance must be stated. Studies about new diagnostic tools are also within the scope if they hold promise of broad application. Regarding comprehensive data sets of genetic profiling (microarray) studies, raw data must be in a publicly available database that requires MIAME format (for example, "GEO" or "Array Express") upon submission of a paper. Should expert reviewers of the IJC request access to these primary data, authors need to provide the confidential password that is supplied by the database provider.

[Return to Top](#)

Infectious Causes of Cancer

Contributions to this section should cover novel observations on the role of viral, bacterial, or parasitic infections in human cancers. Mechanistic aspects concerning direct or indirect modes of infectious carcinogens will be of particular interest. Functions of viral oncogenes as well as the discovery of new viruses or other infectious pathogens with growth-stimulating properties for infected cells or tissues will be considered. Indirect modes of carcinogenesis by infections are clearly of interest for the journal. Seroepidemiological and immunological studies related to infectious carcinogens will be considered if they present new data or demonstrate novel links between tumors and infections. The development of vaccines directed against tumor-linked infectious agents and their application is also of substantial interest. We also consider submissions on oncolysis by infectious agents.

[Return to Top](#)

Tumor Immunology

This section covers novel findings on the immunological relationship between tumor and host, including all aspects of cellular and humoral immunity directed at tumor and associated stromal cells. Experimental and clinical studies based on in vivo, ex vivo and in vitro analysis will be considered. Particularly welcome are studies on new and improved preventive and therapeutic approaches exploiting immune effector mechanisms, such as vaccines. The potential relevance of newly identified tumor cell-associated T cell epitopes should be validated by functional in vivo studies.

[Return to Top](#)

Early Detection and Diagnosis

This section covers the area of predictive and diagnostic markers from molecular biology studies. We invite papers that explore the development and application of nucleic acid-based, protein-based, serological, and other approaches that identify biomarkers linked to cancer as well as the results of current investigations using other novel molecular probes as diagnostic and prognostic indicators for cancer detection and therapy.

[Return to Top](#)

Epidemiology

Studies in human populations providing evidence that i) agents/exposures/host-factors pose a carcinogenic risk or are protective, ii) attempt to establish their causal role, iii)

identify (sub-) populations at greatest risk, and iv) host-environment interactions are welcome. These include molecular cancer epidemiology approaches, in which advanced laboratory methods are integrated. Randomized trials, case-control studies, cohort studies, studies of screening and diagnostic tests and intervention studies will be considered. Each manuscript should clearly state an objective or hypothesis, the design and methods (including the source of patients or participants with inclusion/exclusion criteria).

[Return to Top](#)

Cancer Therapy

Reports on new advances in cancer therapy in humans are welcome, especially the results of well-designed randomized trials. If the authors are describing the results of a randomized controlled trial, we recommend use of the style guidelines in describing the study population (see JAMA 1996; 276:637-639). If the authors are describing the results of observational studies of therapy, the standards applicable in observational studies in epidemiology should be followed (see above). We do not publish case reports.

Mini Reviews

Though these are primarily commissioned by the Editors, exceptionally, proposals will be considered and sent for peer review. Presubmission inquiries describing the proposed articles must be sent before submission. The Editors will then indicate whether the review is of potential interest for the journal. [Presentation of Mini Reviews](#)

Forum

Forum papers present interesting and controversial topics in cancer research, hypotheses, methods and applications. They are meant to promote discussion and generate new ideas for further study. [Presentation of Forum Papers](#)

Letters to the Editor

Comments on published papers and controversial issues, also including negative data that are of general interest or that contradict commonly accepted concepts or hypotheses, will be considered for publication as Letters to the Editor. In the former case, the Editors may invite letters containing pertinent and interesting observations concerning cancer research in general, reports on new observations or pilot studies that do not justify a full research article, or comments on published papers will be considered for publication. In the latter case, the Editors may invite the authors of the paper being questioned to respond. Both letters may then be published, if found to be of interest to the Editors.

[Presentation of Letters](#)

Short Reports

Articles containing pertinent and interesting observations concerning cancer research in general and reports on new observations or studies that do not warrant publication as a full research article will be considered for the Short Report section. These articles will undergo full peer review. [Presentation of Short Reports](#)

Special Section Paper

These papers are commissioned by the Editors. Authors of Special Section Papers will be given individual guidance in preparing their manuscripts.

Presentation

Articles should be written in English (either British or American spelling).

Research Articles

Research articles should be divided into these sections:

- Title Page (with short title, corresponding author contact information —address, fax, and email—, three to five key words, abbreviations used, and the appropriate journal category).

Include 2 brief statements describing the novelty and impact of your paper. Please ensure the fax number is correct and list an alternate number if possible).

- Non-structured Summary/Abstract (maximum 250 words)
- Introduction
- Material and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Tables
- Figure Legends.

Please note that we cannot process your paper if the abstract or the references do not conform to IJC style.

Mini Reviews

Length should not exceed 4,000 words (3 printed journal pages) plus figures and tables and approximately 50 references. [Return to Top](#)

Presentation of Forum papers

Length should not exceed 4,000 words (3 printed journal pages) plus figures and tables and approximately 50 references. [Return to Top](#)

Letters to the Editor

Letters should begin with a title page (with the heading Letter to the Editor and corresponding author contact information—address, fax, and email). Length should not exceed 2,500 words. [Return to Top](#)

Short Reports

Short Reports should begin with a title page (with the heading Short Report and corresponding author contact information—address, fax, and email). Length should not exceed 4,000 words.

General Elements of Manuscripts

Sponsorship and Funding/Financial Disclosure

The Acknowledgments section is an appropriate place to recognize coworkers, indicate funding sources, and disclose information about affiliations and potential conflicts of interest (for example, commercial affiliations, patent-licensing arrangements). The International Journal of Cancer subscribes to the guidelines published by Davidoff et al. in the New England Journal of Medicine¹ and to the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.”² Authors must state all their sources of funding and any other financial and personal relationships that might bias their work. If the research reported in the manuscript has received partial or complete funding from commercial sponsors, the authors must also include a statement to that effect. The Editors reserve the right not to consider a manuscript if a sponsor has asserted control over the authors' right to publish their research results. Therefore, if the authors have a potential financial or personal conflict of interest, they must submit the [Conflict of Interest](#) form.

[Return to Top](#)

Gene Names

Please mark all gene names in italics. Only the gene names should be written in italics, to distinguish them from gene products, gene segments, clusters, families, complexes, or groups. Authors should only use the official gene name as assigned by the respective gene nomenclature committee.

[Return to Top](#)

References

The Journal introduces a new reference style. If you use the program EndNote, please note that you can download the [IJC reference style sheet](#) from the Wiley Interscience

page. Please see examples below.

References are listed in a separate reference section immediately following the text. All references must be verified by the corresponding author who submits the manuscript to International Journal of Cancer. Follow the style of the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals"² for reference format and Index Medicus³ for standard journal abbreviations (please see examples below). Number references sequentially in the order cited in the text; do not alphabetize. A reference cited only in a table or figure is numbered in the sequence established by the first mention in the text of the table or figure containing the reference.

Reference to a personal communication or to a manuscript categorized as in preparation or submitted for publication is discouraged. However, if such a reference is essential and refers to a written communication, the source is cited parenthetically in the text (not in the reference section) with the comment "unpublished data" or "personal communication."

Written permission from the source that is cited must be sent to the Editorial Office.

Reference to a paper accepted but not yet published is listed in the reference section as "in press." "In press" references must be updated by the authors as soon as publication data is available.

Provide names of all authors in a reference when there are twelve or fewer; if there are thirteen or more authors, list the first twelve, followed by "et al."

Journal references shall include the specified information listed in the following order: authors, article title and subtitle, journal abbreviation, year, volume number in Arabic numerals, and inclusive pages:

Cohn KH, Ornstein DL, Wang F, LaPaix FD, Phipps K, Edelsberg C, Zuna R, Mott LA, Dunn JL. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma: results of a 5-year follow-up study. *Cancer* 1997;79:233-44

Book references are listed as follows: authors, title, edition (if other than the first), volume (if more than one), city, publisher, year, pages:

Sobin LH, Wittekind C, eds. *TNM classification of malignant tumors*, 5th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. 227p

When referencing a book chapter, the order changes as follows: authors of the chapter, title of the chapter, "In:" editors/authors of the book, title of the book, edition (if there are more than one), volume (if there are more than one), city, publisher, year, and inclusive pages of the chapter:

Luketich JD, Ginsberg RJ. Diagnosis and staging of lung cancer. In: Johnson BE, Johnson DH. *Lung cancer*. New York: Wiley-Liss, Inc., 1995:161-73.

[Return to Top](#)

Figures

Authors should upload high-quality graphic data for figures. For use in the peer review process, the Editorial office can use PPT, GIF, TIF, JPG, and EPS files. Figures may be submitted in these formats. However, the preferred format is tif or eps, which would be required when the paper is accepted.

Electronic Supplementary Material

Material that is not suitable for print publication such as very long tables, database information, etc. can be published online as electronic supplementary material. The final

decision to do so, however, lies with the Editors. Please submit camera-ready files for this material as it will not be edited or altered in any way by the publisher.

[Return to Top](#)

Editorial Process

All papers are assessed initially by the editors. A selection of papers is then sent for external review to experts in the field. When a decision is reached, a decision letter is sent to the authors by email and the decision is posted on the IJC website (<http://mc.manuscriptcentral.com/ijc-wiley>), where the comments of the referees can also be viewed. Decision letters for papers not sent for review are also sent by email and the decision also posted. To aid in the peer review, we invite authors to suggest potential reviewers of their paper (including address, fax, and email) in the cover letter, on the submission form or in the online submission procedure. The authors also have the option of naming nonpreferred reviewers. Receipt of a manuscript is acknowledged by email. We remind you that in submitting to International Journal of Cancer you agree that your work is original in presentation and content and that the work has neither been published elsewhere — including being posted on any site on the Internet — nor is simultaneously under submission as a complete paper with another journal.

[Return to Top](#)

Submission Procedure

New Submissions

Please submit all new manuscripts online. Individual files should be uploaded for the text (doc or rtf format), tables (doc or rtf for text or tif or eps for graphics) and figures (tif or eps). You do not need to mail any copies. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/ijc-wiley/>. Check for an existing account. If you are submitting for the first time, create a new account. Follow the step-by-step instructions. Please note that the paper should be submitted by or on behalf of the corresponding author so that he/she receives all correspondence from the system.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with a manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact technical support at edsupport@wiley.com. Exceptionally, manuscripts can be submitted by express mail or post, by email, or by ftp. Please contact the Editorial Office by email regarding specific requirements.

Required Documents for New Submissions

For new submissions we require the following documents, which can be uploaded as a pdf file to the web or sent to us by fax or mail. The required forms can be found on our website (<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jabout/29331/ForAuthors.html>). They can be submitted by post, fax, email, or uploaded to the website along with the manuscript.

Cover Letter. Please introduce your work in a cover letter in which you address the following questions:

- What is the aim of the study?
- What are the significant and novel findings?
- How do these findings relate to the present state of the field?

Submission Form. The Journal requires written consent of all authors upon submission and again upon acceptance, verifying agreement with content and presentation, and knowledge of submission to International Journal of Cancer Financial Disclosure/Conflict of Interest Form. Authors are requested to provide a statement concerning any commercial sponsorship, commercial affiliations, stock/equity interests, or patent licenses

of potential financial disclosure with the work presented in the submitted paper. Each author who has NOT checked the box on the submission form indicating that he/she has no conflict of interest must submit the **Conflict of Interest form**. The paper cannot be processed until these forms are complete.. See section on [Sponsorship and Funding/Financial Disclosure](#).

Copyright Transfer Agreement (signed by at least one author)

Letter of Permission. Permission is required from the appropriate investigators when "personal communication" or "unpublished data" is cited in the manuscript or from the publisher if previously published material has been used in the manuscript.

[Return to Top](#)

Submission of Revised Manuscripts

If you have been invited to submit a revised manuscript, please submit it online via your author center. Instructions can be found there:

Enter your point-by-point responses to the associate editor and reviewers separately at the "View and Respond" button.

Upload two versions of the revised paper, one clean copy and another with all changes underlined or marked. Please also reupload figures and tables.

Editorial Decisions

Rejected Papers

Papers may be rejected either based on the opinions of the Editors or based on the comments of external reviewers. Papers not reaching a high enough level of priority or not fitting within the scope of the Journal will be returned to authors without detailed comments. Only papers of high priority will be considered. We will keep any glossy figures of rejected manuscripts for 3 months and will return them upon request.

[Return to Top](#)

Revisions Requested

If the Editors and the reviewers respond positively to a paper and are interested in considering it further after additional work is included, authors will be invited to resubmit the manuscript to IJC. A decision letter will be sent by email containing the comments of the referees and/or Editors. We ask that revisions are made within 3 months. Any questions concerning the requested changes/additional work should be addressed to the Editors by fax or email before submission of the revised paper. Revised manuscripts may be returned to the original reviewers for reassessment. Therefore, the review process of the revised manuscript may take over a month in some cases. The Editors maintain the option to reject a paper in a second or third round of revision if the specific concerns have not been met or if the paper still does not meet a high enough level of priority. Please always include the manuscript number in any correspondence and the submission documents.

[Return to Top](#)

Accepted Papers

When a manuscript is accepted for publication by the editors, it is sent to the publisher (Wiley-Liss, Inc., Hoboken, NJ) for typesetting, copyediting and printing. An electronic proof of the typeset and copyedited version will be sent to the author for approval. We ask that you report any changes immediately to the publisher. Manuscripts will be held in the Heidelberg editorial office if outstanding materials are required (submission form for final, accepted version of the paper, conflict of interest form, and copyright transfer agreement if this has not been submitted previously). Electronic proofs may take approximately 6 weeks to generate. The publisher, Wiley-Liss, Inc., may be contacted with questions about proofs. See contact information.

[Return to Top](#)

Publication and Technical Information

Guidelines for Final Version of Accepted Papers

The final versions of accepted papers (text, tables and figures) should be sent to the editorial office in electronic form, preferably as email attachments to intjcanc@dkfz.de.

Text

Software and Format. The latest version of Microsoft Word or Rich Text Format (RTF) is preferred, although manuscripts prepared with other operating systems and software may be accommodated. Do not use desktop publishing software such as Aldus PageMaker or Quark XPress. If you prepared your manuscript with one of these programs, including EndNote, please export the text to a word processing format.

[Return to Top](#)

Figures

Authors should upload high-quality graphic data for figures. The required format is TIFF or EPS.

All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. When necessary to convey essential scientific information authors are encouraged to submit color illustrations. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

All print reproduction requires files for full color images to be in a CMYK color space.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to RapidInspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/zwi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

Software and Format. All figures of accepted manuscripts should be in TIFF or EPS formats.

Resolution. The minimum requirements for resolution are:

1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Color Art. Resolution should be at least 300 dpi for all color figures. Files must be in CMYK format.

File names. Illustration files should be named by the figure number and the 3-letter extension that identifies the file format used (i.e., .tif, .eps).

[Return to Top](#)

Charges

Page Charges

There is no fee for the first 8 pages of an article. A fee of US\$150.00 for each page beyond the first 8 will be charged. (To calculate the number of printed pages your manuscript will become, count the number of text pages, allowing a page for each table and figure, and divide the total by 3. This gives a rough estimate.)

[Return to Top](#)

Color Charges

Please be aware that the cost of color printing will be incurred by the author. The color fee is US\$500 per page.

[Return to Top](#)

Notice of Wiley's Compliance with NIH Grants and Contracts Policy

Recently, the National Institutes of Health (NIH) has requested that its grantees submit copies of manuscripts upon their acceptance for publication to PubMedCentral (PMC), a repository housed within the National Library of Medicine. On behalf of our authors who are also NIH grantees, Wiley will deposit in PMC at the same time that the article is published in our journal the peer-reviewed version of the author's manuscript. Wiley will stipulate that the manuscript may be available for "public access" in PMC 12 months after the date of publication. By assuming this responsibility, Wiley will ensure that authors are in compliance with the NIH request, as well as make certain the appropriate version of the manuscript is deposited. When an NIH grant is mentioned in the Acknowledgments or any other section of a manuscript, Wiley will assume that the author wants the manuscript deposited into PMC, unless the author states otherwise. The author can communicate this via email, or a note in the manuscript. The version of the manuscript that Wiley sends to PMC will be the accepted version, i.e. the version that the journal's Editor-in-Chief sends to Wiley for publication. Wiley will notify the author when the manuscript has been sent to PMC. Because Wiley is taking the responsibility for sending the manuscripts to PMC, in order to ensure an orderly process, authors should not deposit Wiley articles to PMC themselves. Authors should not make corrections to their Wiley-deposited manuscripts in PMC. Wiley reserves the right to change or rescind this policy. For further information, please get in touch with your editorial contact at Wiley, or see the NIH Policy on Public Access, located at: <http://www.nih.gov/about/publicaccess/>.

Contact Information

We invite inquiries to the editorial office at any time during the editorial process. For all matters concerning presubmission, editorial policies and procedures, and general production matters, please contact the Heidelberg editorial office. Specific questions regarding your proofs and copy editing of your manuscript can be handled by the publisher, Wiley-Liss, Inc., in Hoboken. You can reach the publisher's production department at ijcprod@wiley.com

Footnotes

1

Davidoff F, DeAngelis CD, Drazen JM, Nicholls MG, Hoey J, Hojgaard L, Horton R, Kotzin S, Nylenna M, Overbeke AJ, Sox HC, Van Der Weyden MB, Wilkes MS. Sponsorship, authorship, and accountability. N Engl J Med 2001;345:825-6.

2

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Intern Med 1997;126:36-47. Update 2005 available at <http://www.ICMJE.org>

3

National Library of Medicine. List of journals indexed in index medicus. Washington, DC: US Government Printing Office [published annually].