

TIAGO LEANDRO MARCIANO

Estudo comparativo entre a presença do DNA do papiloma vírus humano detectado através da PCR e a coilocitose em pacientes com carcinoma epidermóide de boca.

ARAÇATUBA - SP

2009

TIAGO LEANDRO MARCIANO

Estudo comparativo entre a presença do DNA do papiloma vírus humano detectado através da PCR e a coilocitose em pacientes com carcinoma epidermóide de boca.

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

ARAÇATUBA - SP

2009

Dedicatória

A Deus, por me proteger e guiar em todos os momentos.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Madalena, e à minha irmã, Lucimara, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, confiança, carinho, amizade e incansável apoio em todos os momentos da minha vida. Minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Aos docentes da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que, nos anos de convivência, muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, por ter me dado a oportunidade de realizar um trabalho de iniciação científica e pela atenção, apoio, compreensão e amizade durante o processo de definição e orientação.

À pós-graduanda Adriana Demathé pela amizade e pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

A toda equipe do Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pela amizade e colaboração.

Ao Instituto de Patologia de Araçatuba, pela ajuda com os blocos parafinados e pela revisão das lâminas.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela atenção e paciência em todos os momentos.

A todos os colegas graduandos e pós-graduandos, meu muito obrigado pelo convívio, pela amizade e pela troca de experiências.

Aos pacientes, que tornaram este trabalho realidade, a minha gratidão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

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

Epígrafe

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

Martin Luther King

MARCIANO, T.L. **Estudo comparativo entre a presença do DNA do papiloma vírus humano detectado através da PCR e a coilocitose em pacientes com carcinoma epidermóide de boca.** 2009. 25 f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Resumo

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus epiteliotrópico, cujo material genético é o DNA, sendo considerado um fator etiológico do câncer de colo de útero e recentemente esta relação para o câncer oral também tem sido investigado. A presença do HPV no carcinoma epidermóide é sugerida através dos aspectos morfológicos vistos na microscopia óptica e destaca-se a coilocitose como um sinal patognomônico de infecção por esse vírus. Já a reação em cadeia da polimerase (PCR), considerada como um meio de alta sensibilidade possibilita a confirmação da presença do DNA do HPV nas peças dos pacientes. O objetivo deste trabalho foi estudar a correlação entre a coilocitose e a presença do DNA do papilomavírus humano. As peças oriundas de blocos de parafina de pacientes com carcinoma epidermóide de boca foram coradas através da hematoxilina e eosina e examinadas no microscópio óptico para investigação da presença da coilocitose. O resultado obtido foram 62,7% dos casos não apresentaram coilocitose, 22,9% apresentaram baixa, 10,8% média e 3,6% alta quantidade de coilocitose. A partir dos mesmos blocos foi realizada a extração do DNA para análise pela PCR, onde foi verificada a presença do DNA do HPV em 33,7% das amostras. Os resultados foram submetidos à análise estatística e não foi observada uma relação estatisticamente significativa.

Palavras-chave: Reação em cadeia da polimerase. Carcinoma de células escamosas. Papillomavirus humano.

MARCIANO, T.L. **Comparative study between the presence of DNA of Human papillomavirus detected by PCR and koilocytosis in patients with squamous cell carcinoma of the mouth.** 2009. 25 f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is an epitheliotropic DNA virus and is considered an etiological factor of uterine cervix cancer and recently its relation to oral cancer has also been investigated. The presence of HPV in squamous cell carcinoma is suggested by the morphologic characteristic seen in optical microscopy, standing out the koilocytosis as a pathognomonic sign of virus infection. The polymerase chain reaction (PCR) is a high sensitivity method because it allows the confirmation of the presence of HPV DNA in paraffin blocks even in a low number of the HPV DNA in the sample. Our objective was to study the correlation between koilocytosis and the presence of HPV DNA. The samples were obtained from paraffin blocks of patients with oral squamous cell carcinoma and were stained by hematoxylin and eosin and examined in optical microscope to investigate the presence of koilocytosis. The microscopical analysis revealed that 62.7% of the samples showed no koilocytosis, 22.9% had low, 10.8% medium and 3.6% high amount of koilocytosis. DNA extraction for PCR analysis was done using the same blocks and the HPV DNA presence was observed in 33.7% of samples. The results were subjected to statistical analysis and no statistically significant relationship was observed.

Keywords: Polymerase chain reaction. Squamous cell carcinoma. Human papillomavirus.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 29 das 83 amostras de carcinoma espinocelular de boca 16
- *PM = peso molecular de 100 pb; CO1 = controle positivo 1 (DNA extraído de HeLa); CO2 = controle positivo 2 (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle negativo (sem DNA)
- Figura 2 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular de boca apresentando os coilócitos distribuídos na camada superficial do epitélio (HE-200x) 17

Lista de Tabelas

Tabela 1	Detecção do HPV pela PCR e presença da 15 coilocitose através da microscopia óptica	15
----------	--	----

Sumário

1	Introdução	10
2	Material e Métodos	12
3	Resultados	15
4	Discussão	18
5	Conclusão	20
	Referências	21
	Anexos	25

1. Introdução

O Câncer é um problema de saúde pública no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Com uma estimativa de 14.160 novos casos no Brasil, o câncer bucal manter-se-á como o 5º de maior incidência na população brasileira masculina com uma taxa bruta de 11,00 por 100.000 e o 7º na feminina com uma taxa bruta de 3,88 por 100.000. O Carcinoma epidermóide corresponde a 90% das neoplasias da boca, comumente encontrada em homens com mais de 40 anos de idade¹.

Entre os fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral, podemos destacar os hábitos de fumar, mascar tabaco e ingerir bebidas alcoólicas. No entanto, estes fatores estão ausentes em muitos casos, indicando outros possíveis fatores etiológicos, os quais poderão incluir o HPV ou outros agentes infecciosos^{2,3,4,5}.

Na cavidade oral a infecção pelo HPV está envolvida no desenvolvimento do papiloma de células escamosas, condiloma acuminado, verruga vulgar, e hiperplasia epitelial focal^{6,7}. O DNA do HPV foi encontrado também em amostras de leucoplasia oral, líquen plano e carcinoma epidermóide, apesar de seu papel etiológico ainda permanecer obscuro⁸.

O HPV é transmitido principalmente através de relações sexuais, podendo também ocorrer a contaminação durante o parto ou até mesmo através de auto-inoculações⁹.

A verdadeira relação entre o papilomavírus humano (HPV) e o carcinoma epidermóide bucal é bastante estudada. Alguns autores acreditam que a presença do HPV em lesões malignas pode ser puramente casualidade ou agir como co-fator junto com os fatores do meio ambiente ou combinado com estes fatores para induzir a formação de lesões^{10,11,12,13,14}.

Dentre os fatores que levam os autores a acreditarem na relação do HPV com a carcinogênese oral podem ser destacadas a demonstração por estudos in vitro de que o HPV pode imortalizar ceratinócitos^{12,15} e as semelhanças morfológicas entre os epitélios orofaríngeo e genital^{16,17,18}, uma vez que já é conhecido o potencial oncogênico dos HPVs de alto risco nas doenças neoplásicas anogenitais^{14,19}.

A microscopia ótica é o meio mais utilizado nas rotinas dos institutos de patologia para o diagnóstico das lesões além de ser um método de grande utilidade em centros que não dispõem de métodos de diagnóstico sofisticados.

Syrjänen et al.²⁰ relatam que dentre todos os aspectos morfológicos da presença do HPV observados através da microscopia ótica em cortes histológicos corados através da hematoxilina e eosina, a coilocitose pode ser considerada um sinal patognomônico de infecção por esse vírus, sendo também relatado como o clássico efeito citopático viral⁹.

Atualmente existem várias técnicas de detecção do DNA do HPV, sendo este um fator da grande variabilidade na verdadeira taxa de presença do DNA do HPV nos casos de carcinoma epidermóide oral²¹. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um exame diagnóstico de alta sensibilidade na confirmação da presença do DNA do HPV nas peças dos pacientes com carcinoma, sendo capaz de detectar até a presença de apenas uma cópia de DNA do vírus^{22,23,24}.

Desta forma é muito importante estabelecer uma relação entre a coilocitose observada através da microscopia ótica e a presença do HPV detectada através da PCR. Nosso trabalho teve como base um trabalho anteriormente realizado, sendo que o número de peças analisadas foi aumentado de 30 para 90 peças, no intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados e obter um resultado mais fidedigno.

2. Material e Métodos

Este estudo baseia-se numa análise retrospectiva de 90 peças oriundas de blocos de parafina referentes à pacientes portadores de Carcinoma epidermóide oral, diagnosticados e tratados no período entre 1991 e 2008 no Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Foram adotados os seguintes critérios de elegibilidade para inclusão de casos:

A - Pacientes com diagnóstico histológico confirmado de Carcinoma epidermóide.

B - Pacientes tratados com registro Centro de Oncologia Bucal – Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP e que não abandonaram ou interromperam o tratamento.

C - Pacientes submetidos à cirurgia.

D - Pacientes tratados com finalidade curativa.

Estudo histológico

Para o estudo histológico, foram realizados cortes de 04 micrômetros dos blocos de parafina dos pacientes portadores de Carcinoma epidermóide e posteriormente corados pelo método de coloração de hematoxilina - eosina. Numa primeira etapa a peça foi submetida à fixação em fixador simples em mistura fixadora (líquido de Bouin, Helly) para preservação da morfologia e da composição dos tecidos por cerca de 12 horas, dependendo do fixador e do tamanho da peça.

Em seguida foi desidratada em álcool etílico de concentrações crescentes, começando com álcool a 70% e terminando com álcool absoluto para remover a água dos tecidos por 6 a 24 horas. Para o clareamento ou diafanização em benzol, xilol ou tuluol, solventes do álcool e da parafina de uma a 6 horas.

Numa quarta etapa a peça foi impregnada pela parafina fundida em estufa a 60º por 30 minutos a 6 horas. Posteriormente a peça foi incluída num molde retangular contendo parafina fundida para obtenção de um bloco de parafina de forma regular, para então ser cortado no micrótomo.

Finalmente a peça foi corada com hematoxilina e eosina. A hematoxilina cora em azul os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida (basófilas), como

as regiões do citoplasma ricas em RNA. Em contraste, a eosina cora o citoplasma e o colágeno do material extracelular em diversas tonalidades do vermelho.

Após a coloração, analisamos a presença de coilocitose, sinal patognômico de infecção por HPV. Após a análise e discussão para uma decisão em comum para cada caso, classificamos os casos, de acordo com o número de coilócitos encontrados nas lamínas, em: não sugestivo de HPV, com baixa sugestibilidade para o HPV, média sugestibilidade para o HPV e alta sugestibilidade para o HPV.

Estudo da detecção do HPV pela PCR

Dos mesmos blocos de parafina foram realizados cortes para extração do DNA. Foram obtidos cinco cortes histológicos com 10 micrômetros cada, coletados em tubos limpos de 1,5 mililitros (ml).

O DNA extraído na coluna foi diluído pela adição de 40 µl de solução TE (Tris 10mM pH7,4, EDTA 1mM) pré-tratada a 65°C e centrifugado a 11.000 rpm por 15 segundos, após ter sido transferido do dispositivo para um tubo de recuperação de amostra. As amostras foram armazenadas a 20°C negativos.

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene Beta-globina, gene humano que deve estar presente para confirmar a integridade e presença do DNA nas peças cirúrgicas parafinizadas.

A análise foi realizada com o auxílio de um gel de poliacrilamida 8% e a eletroforese foi realizada com o auxílio de uma Fonte Eletroforética (Amersham pharmacia biotech modelo EP3501, Suécia) durante 2 horas a 160Volts, 37miliampères, 6Watts).

Após esta confirmação em 83 das 90 amostras iniciais foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores (GP5+ e GP6+) para amplificar fragmentos da região tardia do HPV, com 150 pares de bases.

As reações foram feitas em um ciclador de temperatura programável (Peltier Effect Cycling modelo PTC-100, M.J. Research, EUA) o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação, com as seguintes condições de temperatura para o HPV:

No primeiro ciclo a temperatura é elevada a 95°C por 5 minutos para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Em seguida a temperatura é reduzida para 40°C, permanecendo assim por 2 minutos para que os primers se pareiem com a fita molde de DNA (anelamento). Por último a temperatura é elevada

a 72°C por 1 minuto e 30 segundos para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado.

Nos ciclos de 2 a 39 a temperatura é elevada a 95°C por 1 minuto para que ocorra a desnaturação; em seguida reduz-se a temperatura para 40°C por 2 minutos para que ocorra o anelamento e por último eleva-se a temperatura para 72°C por 1 minuto e 30 segundos para que ocorra a extensão.

No último ciclo a temperatura é elevada a 95°C por 1 minuto para que ocorra a desnaturação; reduzindo em seguida para 40°C por 2 minutos para ocorrer o emparelhamento e finalmente eleva-se a temperatura para 72°C por 8 minutos para que ocorra a extensão.

A análise foi realizada com o auxílio de um gel de poliacrilamida 8% e a eletroforese foi realizada com o auxílio de uma Fonte Eletroforética (Amersham pharmacia biotech modelo EP3501, Suécia) durante 2 horas a 160Volts, 500miliampères, (100Watts).

Após a análise do gel, foi verificada a presença de bandas para confirmar a presença do HPV e os casos foram classificados em dois grupos: com a presença de HPV e sem a presença de HPV.

Forma de análise dos resultados

Os casos de Carcinoma epidermóide de boca em que foram verificados a coilocitose foram comparados com os casos que tiveram a presença do HPV confirmada pela PCR. Todos estes dados foram comparados entre si através da análise estatística do teste de X^2 ou teste de Fisher.

3. Resultados

Das 90 peças analisadas, 7 não apresentaram o gene betaglobina humano, o qual deve estar presente para confirmar a integridade e presença do DNA nas peças cirúrgicas parafinizadas e por isso foram excluídas do estudo. Os resultados das 83 peças analisadas estão apresentados na tabela 01.

Tabela 01 - Detecção do HPV pela PCR e presença da coilocitose através da microscopia óptica					
Nº no Estudo	(HPV) PCR	coilocitose	Nº no Estudo	(HPV) PCR	coilocitose
1	+	0	43	-	0
2	+	1	44	-	1
3	-	0	45	-	0
4	+	1	46	-	2
5	+	0	47	-	1
6	-	0	48	-	0
7	-	0	49	-	1
8	-	0	50	-	0
9	+	0	51	-	0
10	-	0	52	-	0
11	-	1	53	-	0
12	-	0	54	-	0
13	-	0	55	-	0
14	-	2	56	-	3
15	-	0	57	-	0
16	-	0	58	-	1
17	-	1	59	+	1
18	-	1	60	-	0
19	-	0	61	-	3
20	-	1	62	-	0
21	+	0	63	-	2
22	-	0	64	-	0
23	-	1	65	+	1
24	+	1	66	-	0
25	+	2	67	-	0
26	+	0	68	-	0
27	+	0	69	+	0
28	+	0	70	-	0
29	+	0	71	-	0
30	+	2	72	+	0
31	+	2	73	-	0
32	+	1	74	-	0
33	+	1	75	-	0
34	+	2	76	-	0
35	+	2	77	-	1
36	+	0	78	-	3
37	+	0	79	-	0
38	+	0	80	+	0
39	+	0	81	-	0
40	+	0	82	-	1
41	-	1	83	-	2
42	-	0			

(+) positivo e (-) negativo para a presença do HPV através da PCR,
(0) ausência de coilocitose (1) baixa, (2) média e (3) alta quantidade de coilocitose.

Dos 55 casos negativos para a presença do HPV através da PCR (Figura 01), 36 não apresentaram e 19 apresentaram a coilocitose (Figura 02). Destes, 12 apresentaram baixa, 4 média e 3 alta quantidade de coilocitose.

Quanto aos 28 casos em que foi identificado o DNA do HPV através da PCR, 16 não apresentaram e 12 apresentaram a coilocitose. Destes, 7 apresentaram baixa, 5 média e nenhum caso apresentou alta quantidade de coilocitose.

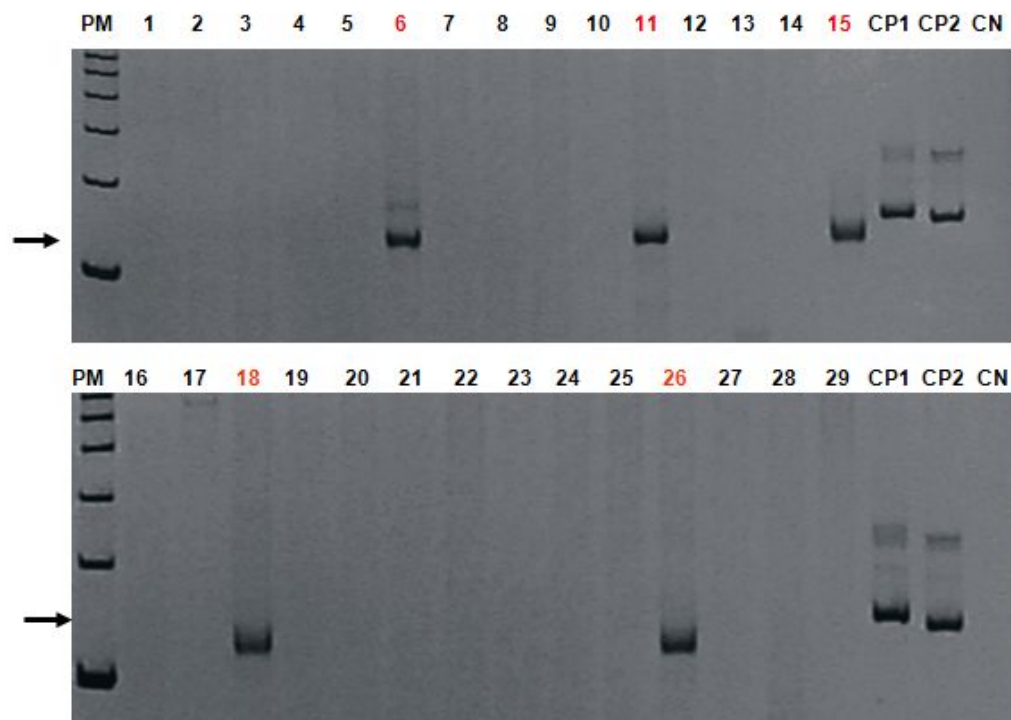


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR de 29 das 83 amostras de carcinoma espinocelular de boca

*PM = peso molecular de 100 pb; CO1 = controle positivo 1 (DNA extraído de HeLa); CO2 = controle positivo 2 (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle negativo (sem DNA)

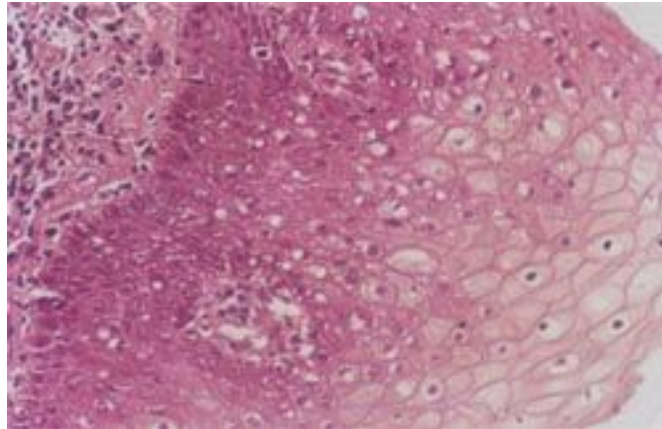


Figura 2: Fotomicrografia de carcinoma espinocelular de boca apresentando os coilócitos distribuídos na camada superficial do epitélio (HE-200x)

As análises estatísticas foram realizadas de duas formas. A primeira foi entre o grupo com presença de DNA viral através da PCR e os grupos sem coilocitose e as diferentes quantidades de coilocitose, através do método de qui-quadrado. O resultado não foi estatisticamente significativo ($p= 0,2920$). A segunda foi entre o grupo com presença de DNA viral através da PCR e os grupos com e sem coilocitose. Da mesma forma, o resultado não foi estatisticamente significativo através do método de Fisher ($p= 0,3069$).

4. Discussão

A frequência de infecção pelo papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral é bastante variável, indo de 0% a 100% nos estudos encontrados na literatura. Esta grande variação se deve principalmente às diferenças de sensibilidade das metodologias aplicadas, dos grupos de pacientes examinados quanto ao aspecto etno-geográfico^{21,24,25} e do local da lesão, sendo este último fator o maior responsável pela atual controvérsia do real papel do HPV na carcinogênese oral^{25,26}.

Em um trabalho de meta-análise feito incluindo estudos de 1982 a 1997 a detecção de HPV em carcinoma de células escamosas de orofaringe variou entre 36,6% e 55,5%²⁷. Já na meta-análise realizada por Termine et al.²⁵ classificando os trabalhos de acordo com a localização das lesões na cavidade oral verificaram que a prevalência do HPV foi maior nos carcinomas de orofaringe (38,1%) que nos carcinomas de cabeça e pescoço em geral (24,1%). Em nosso trabalho analisamos carcinoma epidermóide oral e a prevalência do HPV foi maior (33,7%) do que a citada por Termine et al.²⁵ para carcinomas de cabeça e pescoço em geral, entretanto ficou muito próxima da média (34,5%) dos resultados obtidos nos estudos sobre carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço utilizando PCR relatado na revisão de literatura feita por Campisi et al.⁹. Este mesmo trabalho compara a prevalência da detecção do DNA do HPV utilizando Southern blotting (24,5%) com a encontrada através da PCR (34,5%), apontando esta como a técnica mais indicada, tendo inclusive trabalhos que a citam como um "padrão ouro" para identificação do DNA do HPV²⁶.

No trabalho de Fujita et al.¹⁵ o HPV foi detectado em 26% dos espécimes de carcinoma verrucoso utilizando o método da Hibridização *In situ* e em 48% destas mesmas amostras utilizando a PCR, fato que ajuda a comprovar a maior sensibilidade da PCR.

Segundo Saavedra et al.²⁸ a prevalência do HPV encontrada no câncer bucal utilizando a PCR foi superior (43,5%) à encontrada em nosso trabalho. Ao realizar a tipagem do vírus encontraram 37,1% de HPVs considerados de alto risco, sendo os tipos mais comumente encontrados os HPV-16 (55,6%) e HPV-18 (18,5%). Já nos casos controle a frequência de infecção por HPVs de alto risco foi baixa (9,7%). Este trabalho é compatível com o de Goran-Hansson et al.²⁹ que apresentou 36% dos casos positivo para HPV de alto risco.

D'Souza et al.¹³ realizando a tipagem dos vírus encontraram DNA do HPV-16 em 72% das 100 amostras de carcinoma orofaríngeo conservadas em parafina, reforçando os dados de que este é o tipo de HPV encontrado com maior frequência.

Para Furrer et al.³⁰, os métodos de análise através da PCR e Southern blotting, proporcionam uma maior sensibilidade e especificidade para a detecção do DNA do HPV em comparação com a menor precisão da avaliação do quadro clínico da infecção de HPV e do diagnóstico histopatológico por HE, apesar destes métodos de menor sensibilidade poderem ser utilizados para prevenção de lesões malignas e acompanhamento de pacientes com lesões orais potencialmente malignas e malignas nos países em desenvolvimento, onde as técnicas de biologia molecular não estão facilmente disponíveis.

O exame histopatológico é realizado rotineiramente nos laboratórios de análises clínicas e pode indicar uma infecção por HPV quando se observa a presença da coilocitose, que consiste em células com núcleos picnóticos contornados por extensos halos claros com volume geralmente superior ao citoplasma, visto em lâminas sob microscopia óptica. Esta alteração pode ser considerada um sinal patognomônico da infecção pelo HPV, servindo de base para os estudos de biologia molecular²⁰.

Al-Qahtani et al.³¹ fizeram um estudo retrospectivo analisando 199 pacientes atendidos na Universidade de McGill diagnosticados com carcinoma epidermóide da cavidade bucal, seguido de uma revisão dos cortes histopatológicos de 146 casos que estavam disponíveis. Nesta análise foi encontrada coilocitose em 67% das amostras e foi detectado o DNA do HPV pela PCR em apenas uma amostra. Como o HPV foi negativo em aproximadamente 99,3% das amostras, não puderam afirmar que a coilocitose é uma característica patognomônica da presença do HPV, corroborando com nossos resultados.

Em nosso trabalho classificamos os casos, de acordo com a quantidade de coilocitos encontrados nas lâminas, como sem coilocitose e com baixa, média e alta quantidade de coilocitose. Caso estivéssemos classificando as amostras apenas em coilocitose positivo ou negativo teríamos um resultado de 37,3% de amostras se enquadrando como coilocitose positivo. A análise estatística destes últimos resultados foi semelhante aos primeiros dados apresentados, ou seja, não houve correlação estatística entre a presença da coilocitose com a presença do DNA do HPV.

5. Conclusão

Não foi observada uma relação estatisticamente significativa entre a coilocitose observada pela microscopia óptica e a detecção do DNA do HPV através da PCR em pacientes com carcinoma epidermóide oral.

Referências Bibliográficas

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008**: incidência de câncer no Brasil 2008. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94 p.
2. GONZALEZ, J.V. et al. Human papillomavirus in oral lesions. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 67, n. 4, p. 363-368, jul./ago. 2007.
3. HERRERO, R. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, V. 2003, n. 31, p. 47-51, 2003.
4. ANDREWS, E.; SEAMAN, W.T.; WEBSTER-CYRIAQUE, J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: A role for HPV. **Oral Oncology**, v. 45, n. 6, p. 486-491, jun. 2009.
5. CHATURVEDI, A.K. et al. Incidence trends for human papillomavirus related and unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 4, p. 612–619, fev. 2008.
6. KELLOKOSKI, J. et al. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 19-23, mar. 1992.
7. RINTALA, M. et al. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: A prospective Finnish HPV Family Study. **J. Clin. Virol.**, v. 35, n. 1, p. 89–94, jan 2006.
8. CHANG, F. et al. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 305-317, ago 1991.
9. CAMPISI, G. et al. Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 30, n. 4, p. 813-823, abr. 2007.

10. SUGERMAN, P.B.; SHILLITOE, E.J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis.**, v. 3, n. 3, p. 130-147, set 1997.
11. PAZ, I.B. et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: an association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. **Cancer**, v. 79, n. 3, p. 595-604, 1997.
12. CHAN, P.K.S. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. **J. Clin. Virol.**, v. 33, n. 3, p. 201-205, jul 2005.
13. D'SOUZA, G. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 19, p. 1944-1956, mai 2007.
14. MARTINEZ, I. et al. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Eur. J. Cancer.**, v. 43, n. 2, p. 415-432, jan 2007.
15. FUJITA, S. et al. Human Papillomavirus Infection in Oral Verrucous Carcinoma: Genotyping Analysis and Inverse Correlation with p53 Expression. **Pathobiology**, v. 75, n. 4, p. 257-264, 2008.
16. THOMPSON, I.O. et al. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, n. 12, p. 1091-1098, dez 2001.
17. SYRJANEN, S.M.; SYRJANEN, K.J.; HAPPONEN, R.P. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. **J. Oral Pathol.**, v. 17, n. 6, p. 273-278, jul 1988.
18. SYRJANEN, S. Human papillomavirus infections and oral tumors. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 192, n. 3, p. 123-128, ago 2003.

19. BOSH, F.X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, n. 4, p. 244–265, abr 2002.
20. SYRJÄNEN, K. et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int. J. Oral Surg.**, v. 12, n. 6, p. 418-424, dez 1983.
21. HA, P.K.; CALIFANO, J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 4, p. 188-196, jul 2004.
22. OSTWALD, C. et al. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 192, n. 3, p. 145-148, ago 2003.
23. MAJOR, T. et al. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. **J. Clin. Pathol.**, v. 58, n. 1, p. 51-55, jan 2005.
24. KOYAMA, K.; UOBE, K.; TANAKA, A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 1, p. 18-24, jan 2007.
25. TERMINE, N. et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). **Ann. Oncol.**, v. 19, n. 10, p. 1681–1690, out 2008.
26. ACAY, R. et al. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 4, p. 271–274, ago 2008.
27. MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997. **Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 91, n. 6, p. 622–635, jun 2001.
28. ANAYA-SAAVEDRA, G. et al. High Association of Human Papillomavirus Infection with Oral Cancer: A Case-Control Study. **Arch. Med. Res.**, v. 39, n. 2, p. 189-197, fev 2008.

29. HANSSON, BG. et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. **Acta Otolaryngol.**, v. 125, n. 12, p. 1337-1344, dez. 2005.
30. FURRER, V.E. et al. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 35, n. 6, p. 338–344, jun. 2006.
31. AL-QAHTANI, K. et al. Koilocytosis in oral squamous cell carcinoma: what does it mean? **J. Otolaryngol.**, v. 36, n. 1, p. 26-31, fev. 2007.

Anexos

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 111/2006
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 11 de agosto de 2006.

Referência Processo FOA 2006-00931

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto **"ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS SUGESTIVOS PAPILOMAVÍRUS HUMANO E SUA DETECÇÃO ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA"** 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. GLAUCO ISSAMU MIYAHARA
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.

22/08/06
Glauco
Dr. Glauco-Issamu Miyahara