

Lívia Trevelin Arêde

**Detecção do vírus Epstein-Barr em
carcinoma espinocelular oral e mucosa oral
na região de Araçatuba – SP, Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia do Câmpus de Araçatuba –
Unesp, para a obtenção do Grau de “Mestre em
Odontologia – Área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Adj. Glauco Issamu Miyahara
Co-orientador: Prof. Adj. José Fernando Garcia

**Araçatuba – SP
2010**

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- A678d Arêde, Livia Trevelin.
Detecção do vírus Epstein-Barr em carcinoma espinocelular oral e mucosa oral na região de Araçatuba – SP, Brasil / Livia Trevelin Arêde. - Araçatuba: [s.n.], 2010
62 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara
Coorientador: Prof. José Fernando Garcia
1. Herpesvirus Humano 4 2. Carcinoma de células escamosas
3. Neoplasias bucais 4. Reação em Cadeia da Polimerase

Black D6
CDD 617.63

Dados curriculares

NASCIMENTO	03. 10. 1983 – Araçatuba/SP
FILIAÇÃO	Benedito Aparecido Arêde Íria Maria Trevelin Arêde
2001/2006	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP
2008/2010	Aluna do curso de Pós-Graduação em Odontologia, na área de Estomatologia, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

À minha família e aos meus pais, Íria Maria e Benedito, pelo amor incondicional, pelo apoio, compreensão, pela inspiração na profissão de cirurgiã-dentista e mestre e pela mais rica herança da minha vida – minhas irmãs Cibele e Isabela.

Aos meus amados sobrinhos, Marina e Antônio, por despertarem em mim os melhores sentimentos.

Agradecimentos Especiais

A Deus por me proteger e iluminar meu caminho.

Ao Prof Adj Glauco Issamu Miyahara pela orientação, paciência e palavras de incentivo. Agradeço, com carinho, pela amizade construída.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, na pessoa do seu Diretor, Prof Tit Pedro Felício Estrada Bernabé, pela oportunidade da realização de minha graduação e curso de mestrado. Esta faculdade é a minha casa!

Ao meu co-orientador, Prof Adj José Fernando Garcia, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do curso de Medicina Veterinária da FOA – Unesp, pelo auxílio e acompanhamento desta tese.

Aos professores da disciplina de Estomatologia, Prof Adj Alvimar Lima de Castro, Prof Adj Eder Ricardo Biasoli e Prof Tit Norberto Perri Moraes, pelo aprendizado e por fazerem despertar em mim a paixão pela Estomatologia, a mais completa e inteligente especialidade da odontologia.

Aos docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Prof^a Ass Dr^a Ana Cláudia Okamoto, vice-diretora Ana Maria Pires Soubhia, Prof Ass Dr Antônio Augusto Ferreira de Carvalho, Prof Adj Elerson Gaetti Jardim Júnior, Prof Ass Dr Gilberto Aparecido Coclete, Prof Ass Dr Gilson Machado D'antônio, Prof^a Ass Dr^a Leda Maria Pescinini Salzedas, Prof Ad Marcelo Macedo Crivelini, Prof^a Ass Dr^a Renata Callestini Felipini, pela atenção e por fazerem parte da minha formação acadêmica e científica. Aos ex-professores Acyr Lima de Castro, Ronaldo Melhado e Takeo Furuse os quais não tive o prazer de ser aluna, mas que me sinto feliz e orgulhosa apenas em conhecê-los.

À colega de pós-graduação Adriana Demathé, por me acompanhar no laboratório e me ensinar com tanta paciência, tantas vezes, às vezes a mesma coisa.

Aos “meninos” e “meninas” do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Curso de Medicina Veterinária - Unesp, sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, do COB e de toda a FOA – Unesp, por todos os “bom dia” sinceramente desejados. Em especial ao Diogo da pós-graduação, sinônimo de gentileza e eficiência em nos atender.

A todos os docentes da FOA – Unesp, que participaram da minha formação acadêmica. Com eles, adquiri conhecimentos e fiz amigos.

Aos meus amigos de graduação, de pós-graduação, pessoas que foram e são importantes na minha vida: obrigada pelo prazer de tê-los como amigos!

Epígrafe

*“Eu procuro por mim tal qual o artesão procura sua arte escondida
nos excessos da matéria bruta de seu mármore”*

Pe Fábio de Melo

Arêde LT. Detecção do vírus Epstein-Barr em carcinoma espinocelular oral e mucosa oral na região de Araçatuba – SP, Brasil [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) faz parte da família herpesvirus humano e está relacionado com doenças benignas e malignas de cabeça e pescoço e sua possível relação com o carcinoma espinocelular (CEC) oral tem sido estudada. O objetivo deste estudo foi detectar a presença do EBV em pacientes com CEC oral e mucosa normal, correlacionando os achados com as variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida. Foi aplicada a nested-PCR em peças parafinizadas de CEC oral, sendo 20 amostras de assoalho bucal, 25 de língua e 12 de orofaringe. Também foi utilizado grupo controle, sem carcinoma espinocelular, com 19 amostras de mucosa oral normal. O vírus foi encontrado em 10% das amostras de assoalho bucal e 12% de língua, não sendo detectado na orofaringe. Para as amostras de mucosa normal a prevalência foi de 15,79%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença do vírus e as variáveis: localização anatômica, sexo, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, gradação histológica, esvaziamento cervical e sobrevida. Os resultados sugerem que o EBV não participa isoladamente da carcinogênese oral.

Palavras-chave: Herpesvirus humano 4. Carcinoma de células escamosas. Neoplasias bucais. Reação em cadeia da polimerase.

Arêde LT. Detection of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma and oral mucosa in the region of Araçatuba – Sao Paulo, Brazil [dissertation]. Araçatuba: Sao Paulo State University; 2010.

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) is part of human herpesvirus family being associated with benign and malignant diseases head and neck. Its possible relation with oral squamous cell carcinoma (OSCC) has been studied. The aim of this study was to detect the presence of EBV in patients with OSCC and normal mucosa, correlating the findings with clinicopathologic variables, risk factors and patient's survival. Nested PCR was applied in paraffin embedded samples of OSCC being 20 samples of mouth floor, 25 tongue and 12 oropharyngeal. A control group composed of 19 normal oral mucosa samples was used. The virus was found in 10% of mouth floor samples, 12% of tongue not being detected in oropharynx. The prevalence in oral mucosa samples was 15.79%. There was no statistically significant differences between the virus presence and the variables: anatomical localization, gender, age, smoking, alcoholism, clinical stage, histological grade, neck dissection and patient's survival. The results suggest that EBV alone did not have participation in carcinogenesis or oral SCC.

Keywords: Human herpesvirus 4. Carcinoma squamous cell. Mouth neoplasms. Polymerase chain reaction.

Lista de figuras

- Figura 1** Fotografia do gel de agarose 3% mostrando resultado da amplificação do gene da betaglobina humana (268 pb) por PCR de amostras de carcinoma espinocelular oral. 41
PM = peso molecular de 100 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de sangue humano); NO = controle negativo (sem DNA).
- Figura 2** Fotografia do gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de amostras de carcinoma espinocelular oral (amostras A32 e A34 positivas). 41
PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA).
- Figura 3** Fotografia do gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de amostras de mucosa oral clinicamente saudável (amostras 10A e 13A positivas). 41
PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA).
- Figura 4** Curva de probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma espinocelular segundo a presença ou não do EBV, pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,7$). 42

Lista de tabelas

Tabela 1	Comparação entre a presença de EBV nas três diferentes regiões avaliadas e no grupo controle.	44
Tabela 2	Correlação da presença do EBV com as variáveis clínico-patológicas e fatores de risco dos pacientes com carcinoma espinocelular oral.	45

Lista de abreviaturas

EBV – do inglês Epstein-Barr virus

PCR – do inglês Polimerase Chain Reaction

nPCR – do inglês nested Polimerase Chain Reaction

FOA - UNESP – Faculdade de Odontologia do Campus de Aracatuba - UNESP

DNA – do inglês Deoxyribonucleic Acid

dNTP – do inglês Deoxyribonucleotideo Triphosphate

pb - pares de base

Sumário

1	Resumo	15
2	Introdução	17
3	Proposição	21
4	Material e método	23
5	Resultados	27
6	Discussão	29
7	Conclusão	33
	Referências	36
	Anexos	

1 Resumo

Detecção do vírus Epstein-Barr em carcinoma espinocelular oral e mucosa oral na região de Araçatuba – SP, Brasil

Lívia Trevelin Arêde*

Adriana Demathé**

José Fernando Garcia***

Glauco Issamu Miyahara****

*Mestranda em Estomatologia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

**Doutoranda em Estomatologia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

***Prof. Adj. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

****Prof. Adj. do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Autor para correspondência:

Glauco Issamu Miyahara

miyahara@foa.unesp.br

rua José Bonifácio, 1193

Vila Mendonça – Araçatuba – São Paulo

Fone/fax: 55 18 36363275

1 Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) faz parte da família herpesvirus humano e está relacionado com doenças benignas e malignas de cabeça e pescoço e sua possível relação com o carcinoma espinocelular (CEC) oral tem sido estudada. O objetivo deste estudo foi detectar a presença do EBV em pacientes com CEC oral e mucosa normal, correlacionando os achados com as variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida. Foi aplicada a nested-PCR em peças parafinizadas de CEC oral, sendo 20 amostras de assoalho bucal, 25 de língua e 12 de orofaringe. Também foi utilizado grupo controle, sem carcinoma espinocelular, com 19 amostras de mucosa oral normal. O vírus foi encontrado em 10% das amostras de assoalho bucal e 12% de língua, não sendo detectado na orofaringe. Para as amostras de mucosa normal a prevalência foi de 15,79%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença do vírus e as variáveis: localização anatômica, sexo, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, gradação histológica, metástase cervical e sobrevida. Os resultados sugerem que o EBV não participa isoladamente da carcinogênese oral.

Palavras-chave: Herpesvirus humano 4. Carcinoma de células escamosas. Neoplasias bucais. Reação em cadeia da polimerase.

2 Introdução*

De acordo com a última Classificação Internacional das Doenças (CID 10) da Organização Mundial de Saúde (OMS) [1], o câncer de boca pode acometer lábios, língua, glândulas salivares, gengiva, assoalho, palato, orofaringe e outras localizações orais. Aproximadamente 90% dos cânceres de boca são do tipo carcinoma espinocelular (CEC) e ocorrem 274.000 novos casos e 145.000 mortes por ano no mundo em decorrência da doença, sendo dois terços em países em desenvolvimento [2]. O Brasil está entre os três países em desenvolvimento com maior incidência de câncer de boca, juntamente com Paquistão e Índia. Para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 14.120 novos casos de câncer de boca para 2010 e a mortalidade em cinco anos corresponde a menos de 30%. O fato é atribuído principalmente aos fatores de risco: tabaco e álcool. Contudo outros fatores também são relacionados bem como alterações genéticas, infecção viral e nutrição [3].

Baseado nas informações atualmente disponíveis pode-se afirmar que existem diferentes mecanismos responsáveis pela carcinogênese oral tais como origem genética, infecciosa e pela ação de fatores de risco, incluindo tabaco e subprodutos do álcool, que podem variar de acordo com as diferenças geográficas, culturais, étnicas e sócio-econômicas [4-6]. Uma vez que os cânceres de boca têm sido observados em pequena porção de pacientes sem os fatores de risco, causas como infecção viral tem sido investigadas. Das infecções virais, o vírus Epstein-Barr (EBV) é citado como um possível agente carcinogênico para o câncer de boca [4].

O EBV possui dupla fita de DNA e faz parte da família herpesvirus humano [4-7]. É o mais potente vírus imortalizador celular conhecido até o momento e, paradoxalmente, infecta cerca de 90% da população mundial humana sem causar doença para a maioria dos indivíduos [4, 8-10]. Possui dois subtipos (1 e 2 ou A e B) e sua transmissão ocorre com o contato oral, principalmente durante o beijo [11, 12]. A infecção primária ocorre nos três primeiros anos de vida de forma subclínica. Entretanto, quando ela acomete adolescentes, com frequência desenvolve a mononucleose infecciosa, doença aguda autolimitada [10-11, 13-14].

Além da mononucleose infecciosa, o EBV é o agente etiológico da leucoplasia pilosa e, em seu estado latente, de algumas neoplasias malignas como o carcinoma nasofaríngeo, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin [4, 7, 11-12, 15]. Sand *et al.* [9]

*Normas segundo a revista Clinical Oral Investigations (Anexo B)

sugerem que a combinação entre fatores químicos e EBV possa estar envolvida no desenvolvimento do CEC oral.

Os linfócitos B são as células-alvo iniciais, através do receptor CD21 [16] e, após a infecção primária, uma pequena fração destas células permanece como reservatório de EBV [17]. As células epiteliais da orofaringe e das glândulas salivares são passíveis de infecção, com replicação periódica e eliminação viral na saliva [8, 10, 16]. Os fatores relacionados com a reativação e replicação viral são o estresse e a deficiência imunológica [18].

Na fase de latência, o EBV expressa poucos genes que incluem antígenos nucleares (EBNAs), proteínas latentes de membrana (LMPs) e pequenos RNAs (EBERs) [10, 15] e produz efeito citopático mínimo [9]. Neste estado, o EBV pode ser detectado em linfócitos B e células epiteliais da orofaringe, sendo potencialmente oncogênico para ambos [19].

A presença do EBV tem sido detectada em casos de CEC oral. Inúmeras são as técnicas utilizadas para detecção do vírus, dentre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), a nested-PCR (n-PCR), a imunoistoquímica e as técnicas de hibridização. A PCR é uma técnica de biologia molecular amplamente utilizada para a identificação do EBV em biópsia de lesões orais ou mesmo em saliva. Consiste em um método de amplificação *in vitro* (geração de múltiplas cópias) de DNA, que pode ser realizada a partir de quantidades reduzidas de amostra. A nPCR é uma variação da PCR e tem por objetivo aumentar a especificidade e eficiência da amplificação do DNA alvo, por compreender duas etapas de síntese de DNA, sendo que o material produzido na primeira etapa serve de molde para a segunda [20].

Cruz *et al.* [16] utilizaram diferentes métodos (PCR, hibridização *in situ*, e imunoistoquímica) e concluíram não existir evidências de que o EBV desenvolve papel na carcinogênese. Segundo os autores, a presença do EBV nas amostras de CEC detectadas pela PCR reflete a presença do vírus na saliva. Para Tsang *et al.* [21], o DNA de EBV é raro no câncer de boca e até mesmo em mucosa saudável. Kobayashi *et al.* [22] e Iamaroon *et al.* [23] em seus estudos indicaram que a transcrição do genoma do EBV não ocorre nas células de CEC, sugerindo que o EBV não desempenha papel na carcinogênese oral.

Entretanto, Bagan *et al.* [24] utilizando a técnica da nPCR em amostras frescas encontraram 40% de positividade em CEC oral. Sand *et al.* [9] analisando amostras de CEC por nPCR encontraram 37,9% de positividade para EBV. Para ambos autores o papel do EBV ainda é incerto.

Shimakage *et al.* [14] utilizando técnicas de hibridização *in situ*, imunofluorescência indireta e Southern Blot encontraram RNA mensageiro e proteínas do EBV que são expressas nas maioria dos carcinomas de boca, sugerindo que o EBV pode ser um dos agentes causais destes cânceres. Szkaradkiewicz *et al.* [25] sugerem que a infecção pelo EBV, em condições apropriadas, pode promover a carcinogênese e levar ao desenvolvimento de carcinoma de tonsila palatina ou carcinoma de língua.

Gonzáles-Moles *et al.* [26] concluíram que o EBV pode expressar sua principal oncoproteína, a LMP1, em CEC oral, indicando que sua infecção latente pode influenciar na transformação oncogênica de epitélio oral. Ren *et al.* [27] concluíram que os EBERs participam da transformação maligna do CEC oral. Shamaa *et al.* [28] encontraram aumento da expressão de proteínas do EBV, indicando que o EBV pode contribuir para o crescimento e transformação maligna do carcinoma.

Diante desta controvérsia na literatura, mais estudos são necessário para elucidar o papel do EBV na carcinogênese oral.

3 Proposição

O propósito deste trabalho foi detectar a presença do vírus Epstein-Barr em pacientes com carcinoma espinocelular oral e mucosa clinicamente saudável da cavidade oral residentes na região de Araçatuba – SP, Brasil, comparar as taxas de detecção entre os dois grupos e as variáveis: localização anatômica, sexo, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, gradação histológica, metástase cervical e sobrevida.

4 Material e método

4 Material e método

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Processo nº 2008-00940.

Dois grupos de pacientes foram avaliados, sendo o grupo experimental composto por 57 amostras de peças parafinizadas de pacientes atendidos no Centro de Oncologia Bucal (COB) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP no período de 1991 a 2005 com acompanhamento até o ano de 2010 e o grupo controle, com 19 amostras, composto de peças parafinizadas de pacientes que realizaram ulectomia como tratamento cirúrgico, com finalidade curativa, independentemente desta pesquisa. Dentre as amostras do grupo experimental, todas apresentaram diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular oral, sendo 20 amostras em assoalho bucal, 25 em língua e 12 em orofaringe.

Os dados dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários, sendo a entrada do paciente no COB considerada como data inicial para o estudo de sobrevida.

Os cortes histopatológicos, corados pelo método da hematoxilina e eosina, foram revistos ao microscópio óptico para confirmação do diagnóstico. A gradação histológica das lesões se baseou na classificação da OMS, como carcinoma *in situ*, bem diferenciado, moderadamente e pouco diferenciado [29].

Foram considerados tabagistas os indivíduos que fumaram regularmente durante alguma época da vida, mesmo aqueles que atualmente abandonaram o vício. Os não-tabagistas foram aqueles que em nenhum momento da vida fizeram uso regular do fumo. Para a classificação de etilistas e abstêmios foram usados os mesmos critérios.

O estadiamento clínico utilizado foi aquele proposto pela União Internacional Contra o Câncer, que define a extensão da doença analisando três parâmetros: extensão da neoplasia primária (T); grau de comprometimento de linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M) [30].

Extração do DNA

Com o emprego de micrótomo histológico, foram realizados de 5 a 10 cortes de 10 µm de espessura de cada peça parafinizada até a obtenção de 25 mg de material, procedendo a descontaminação do micrótomo e troca de lâmina entre cada exemplar. Os cortes foram acondicionados em tubos de polipropileno de 1,5 mL devidamente identificados. A extração do DNA foi realizada com o uso do QIAmp DNA minikit® (QIAGEN Ltd, Crawley, UK), conforme as instruções 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). As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da PCR.

PCR para amplificação do gene controle

Como controle de qualidade e verificação de presença e integridade do DNA genômico em todas as amostras obtidas, foi realizada a PCR para amplificação de parte do gene que codifica a cadeia de betaglobina humana, com os oligonucleotídeos iniciadores PC04 (CAACTTCATCCACGTTTCACC) e GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) (Invitrogen Life Technologies, Brasil) que amplificam fragmento de 268 pares de base (pb). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta.

Como controle positivo foram utilizadas amostras de DNA extraído de sangue humano. O controle negativo foi composto pela mistura de amplificação com substituição do DNA por água ultrapura, em mesmo volume.

nPCR para amplificação do EBV

Após a confirmação da integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do DNA do EBV através da técnica da nPCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados fazem parte da região BamHIW do EBV (oligonucleotídeo externo para frente – GAGACCGAAGTGAAGTCCCT, oligonucleotídeo externo para trás – GGTGCCTTCTTAGGAGCTGT, oligonucleotídeo interno para frente – GCCAGAGGTAAGTGGACTTTAAT, oligonucleotídeo interno para trás – GAGGGGACCCTGAGACGGGT) (Integrated DNA Technologies), utilizados a 10 µM, que amplificam fragmento de 100 pb.

Na primeira etapa a mistura de amplificação foi composta por 2.5 µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8; KCl 50 mM) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1,3 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 mM de cada dNTP (deoxyribonucleoside 5'- triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Brasil), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies), 5 µL de amostra de DNA genômico e água ultrapura (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para totalizar o volume final de 50 µL. Os fragmentos foram amplificados em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.). Na segunda etapa da nPCR, que ocorre após a

primeira, os oligonucleotídeos iniciadores amplificam um fragmento de 100 pb dentro da sequência do fragmento amplificado na primeira etapa. Para tanto, utilizou-se como amostra de DNA 1 µL do produto obtido na primeira etapa. A mistura de amplificação e as condições de ciclagem foram semelhantes a da primeira etapa da nPCR, exceto pela substituição dos oligonucleotídeos iniciadores externos pelos internos.

Para controle positivo foi utilizado o DNA extraído de tecido parafinizado de amostra de paciente com diagnóstico histopatológico de Linfoma de Hodgkin. O controle negativo foi composto pela mistura de amplificação com substituição da amostra de DNA por água ultrapura, em mesmo volume.

Os produtos da nPCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 2 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada por coloração com de nitrato de prata.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa EPI INFO versão 3.5.1. Para avaliação das possíveis associações entre a presença do EBV e as variáveis localização anatômica, sexo, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, gradação histológica e metástase cervical foi aplicado o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. A comparação das curvas de probabilidade acumulada de sobrevida, com a presença ou ausência do EBV pelo método de Kaplan-Meier, foi realizada com a aplicação do teste Log-Rank, com nível de significância de 5%.

5 Resultados

Cinquenta e sete casos de carcinoma espinocelular de assoalho bucal, língua e orofaringe foram analisados. As amostras de DNA extraído continham entre 150 e 300 ng/ μ L e foram testadas para a amplificação de parte do gene da betaglobina humana (**Figura 1**). As amostras foram submetidas à detecção do EBV, como pode ser observado parcialmente na **Figura 2**, sendo verificada positividade em 9,75% (5 em 57). No grupo controle foram analisadas 19 amostras de mucosa oral sem carcinoma espinocelular sendo que todas foram positivas para o gene da betaglobina humana. A positividade para o EBV foi de 15,8% (3 em 19), como pode ser observado parcialmente na **Figura 3**.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de CEC de assoalho bucal ou de língua. Não foi possível comparar o grupo controle com a região de orofaringe, pois nenhum caso foi positivo no grupo, **Tabela 1**.

A correlação entre a presença do EBV e as variáveis estudadas (localização anatômica, sexo, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico, gradação histológica, metástase cervical e sobrevida) é mostrada na **Tabela 2**. Não foi observada significância estatística entre as variáveis. Todos os tumores EBV positivos ocorreram em pacientes do sexo masculino e tabagistas.

O teste Log-Rank, que compara as curvas de probabilidade acumulada de sobrevida com a presença ou ausência do EBV (**Figura 4**), também não apresentou significância estatística ($p = 0,7$).

6 Discussão

Dentre os vírus oncogênicos, o EBV tem sido estudado para sua possível relação com a carcinogênese oral [14, 25-28, 31-32]. Para Sand *et al.* [9] e Cruz *et al.* [16] a presença do EBV pode refletir o estado de imunossupressão associado à condição neoplásica. Cruz *et al.* [4] sugerem a participação sinérgica de vírus oncogênicos no desenvolvimento do câncer de boca nos casos em que os fatores de risco não estão presentes.

Estudos sobre a correlação entre o EBV e o câncer de boca mostram discrepância na presença do vírus, como pode ser observado no **Quadro 1**. A variação da taxa de detecção ocorre por vários motivos, dentre eles principalmente o método de detecção utilizado e a localização geográfica do estudo, uma vez que a infecção pelo EBV varia entre as distintas regiões do mundo. Kis *et al.* [8] encontraram 73,8% de positividade para EBV na Hungria utilizando amostras de tecido fresco, o que pode aumentar os índices de detecção, diferente do presente estudo, no qual foram utilizadas peças parafinizadas.

A nPCR, utilizada neste estudo, não indica a localização exata do vírus no interior tecido, portanto a presença do EBV no infiltrado inflamatório não pode ser excluída. O método foi escolhido por ser muito sensível e permitir a utilização de tecido incluído em parafina [9], que durante o processo de extração de DNA sofre degradação de parte do material genético. A vantagem do método é que o tecido parafinado possibilita estudos retrospectivos de longo período. No entanto, é muito provável que a mesma técnica aplicada em tecido fresco aumentasse os índices de detecção do vírus. Por outro lado, o processo de inclusão do tecido em parafina reduz a contaminação da amostra por saliva [21] o que permite descartar a presença do vírus fora do tecido analisado.

Uma vez que o EBV é frequente na população mundial, foi utilizado um grupo controle sem carcinoma para comparar as taxas de detecção. A presença do EBV em mucosa clinicamente saudável encontrada foi de 15,8%. Sand *et al.* [9] encontraram o vírus em 7,3% das amostras, utilizando peças parafinizadas e nPCR, metodologia semelhante àquela empregada no presente estudo. D'Costa *et al.* [31] encontraram 4% de positividade em mucosa clinicamente saudável. Cruz *et al.* [4] não encontraram DNA de EBV em mucosa oral clinicamente saudável. Os autores utilizaram a PCR simples que pode ter limitado a detecção viral. Para Sand *et al.* [9] o EBV é mais prevalente em lesões orais, como CEC, quando comparado com mucosa oral saudável, o que diferiu do observado na presente pesquisa, que

não apresentou diferença estatística entre os grupos com e sem carcinoma. A variação nos resultados pode ser explicada pela localização geográfica das pesquisas [11].

Não houve diferença estatística entre a presença do EBV e a localização anatômica das lesões, resultado que corrobora com o estudo de Sand *et al.* [9]. Também não houve diferença entre cada localização com o grupo controle. Não foi possível aplicar testes na região de orofaringe pela ausência de positividade para EBV. Apesar de não haver significância estatística, o maior número de amostras EBV positivas encontradas neste trabalho foi em língua, dados semelhantes aos de González-Moles *et al.* [32]. A leucoplasia pilosa é uma lesão localizada em borda de língua, causada pelo EBV e associada à imunossupressão. A maior presença do vírus nesta localização pode ser reflexo da imunossupressão encontrada nos pacientes com câncer. Estudo realizado por Kis *et al.* [8] revelou que a prevalência do vírus no CEC oral é semelhante à encontrada em mucosa clinicamente saudável dos mesmo pacientes, fato que indica a presença do vírus relacionada à imunossupressão. A imunossupressão dos pacientes com CEC também pode levar à maior eliminação do EBV na orofaringe e assim o vírus seria mais encontrado nesta região [16], fato não comprovado neste estudo.

Todos os pacientes positivos para EBV eram do sexo masculino, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos feminino e masculino, fato atribuído ao número reduzido de mulheres na amostra, uma vez que Higgins *et al.* [11] encontraram maior soroprevalência do EBV no sexo feminino.

De acordo com o presente estudo, Sand *et al.* [9] e van Heerden *et al.* [33], a prevalência do EBV no câncer de boca não é influenciada pela idade. Em pacientes jovens, abaixo de 45 anos de idade, o CEC oral parece ser mais agressivo e evidências apontam para a ausência de fatores de risco como o fumo e álcool [34]. Nestes casos é possível que vírus como o EBV participe da oncogênese.

Não foi encontrada correlação entre o câncer de boca e a presença do EBV, tabagismo e etilismo, concordando com estudos prévios [4, 9, 31, 35-36]. Entretanto, no presente estudo, todos os pacientes EBV positivo eram tabagistas. Como a amostra de não tabagistas foi reduzida, não foi possível descartar que o EBV estivesse relacionado com tumores neste grupo. É possível que o EBV possa atuar principalmente quando os fatores de risco, como tabaco e álcool, não estejam presentes.

Em relação ao estadiamento clínico, gradação histológica e metástase cervical, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos EBV positivos e negativos. Sand *et al.* [9] e Tsuchida *et al.* [35] não encontraram correlação entre a presença de

EBV e o grau de diferenciação do tumor. Os resultados conflitam com González-Moles *et al.* [32] que relataram associação entre o EBV e CEC pouco ou moderadamente diferenciado e com Maeda *et al.* [37] que associaram o EBV ao CEC pouco diferenciado, enquanto que Kobayashi *et al.* [22] sugeriram que pode haver relação entre EBV e CEC bem diferenciado. Como os diversos trabalhos apresentam resultados conflitantes, é possível fazer uma analogia em relação ao carcinoma nasofaríngeo, que está relacionado ao EBV e possui comportamento altamente agressivo, com infiltração local extensa, disseminação linfática e hematogênica [38]. Partindo deste princípio, é possível que o vírus contribua para maior agressividade do tumor também no câncer de boca.

Não houve correlação entre a sobrevida e a presença do vírus no presente estudo, bem como nos estudos de González-Moles *et al.* [26]. Kobayashi *et al.* [22] sugeriram um bom prognóstico nos casos de CEC EBV positivos. Segundo Maeda *et al.* [37] a presença do EBV não parece estar relacionada com a progressão, metástase ou resposta do carcinoma espinocelular oral ao tratamento. Para Maeda *et al.* [37], maiores amostras poderiam apresentar diferenças nos resultados, pois eles encontraram tendência positiva na correlação entre infecção por EBV e prognóstico.

7 Conclusão

7 Conclusão

Apesar da ausência de significância estatística, houve maior prevalência de EBV em pacientes tabagistas, etilistas, do sexo masculino com gradação histológica moderadamente ou pouco diferenciado.

Não houve correlação estatística entre a presença do vírus e a localização primária do carcinoma espinocelular oral, estadiamento clínico e metástase cervical.

A baixa prevalência do EBV e a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem carcinoma espinocelular oral sugerem que o vírus não participa do desenvolvimento de carcinoma espinocelular oral na região de Araçatuba – SP, Brasil.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

Referências

1. World Health Organization (2004) ICD 10 - International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 2nd revision. WHO, Geneva.
2. Boyle B, Levin B, editors (2008) World Cancer Report 2008. WHO, Lyon.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer (2010) Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro.
4. Cruz I, Brule AV, Steenbergen R, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Snow GB, Van der Waal I (1997) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa: a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol* 33:182-188.
5. Venturi BRM, Cabral MG, Lourenço SQC (2004) Carcinoma de células escamosas oral – contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. *Rev Bras Otorrinolaringol* 70:385-392.
6. Bagan JV, Scully C (2008) Recent advances in oral oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol* 44:103-108.
7. Wong M, Pagano JS, Schiller JT, Tevethia SS, Raab-Traub N, Gruber J (2002) New associations of human papillomavirus, Simian virus 40, and Epstein-Barr virus with Human Cancer. *J Nat Cancer Inst* 94:1832-1836.
8. Kis A, Fehér E, Gáll T, Tar I, Boda R, Tóth ED, Méhes G, Gergely L, Szarka K (2009) Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci* 117:536–540.
9. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM (2002) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 93:586-592.
10. Clemens MJ (2006) Epstein-Barr virus: inhibition of apoptosis as a mechanism of cell transformation. *Int J Biochem Cell Biol* 38:164–169.
11. Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, Thomas R, Reid S, Conacher M, Britton K, Crawford DH (2007) A Study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis* 195:474–482.
12. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K (2002) Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a

- subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol* 55:414–423.
13. Mao EJ, Smith CJ (1993) Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 22:12-17.
 14. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T (2002) Association of Epstein-Barr Virus with oral cancers. *Hum Pathol* 33:608-614.
 15. Moustafa AEA, Chen D, Ghabreau L, Akil N (2009) Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses* 73:184–186.
 16. Cruz I, Van den Brule AJC, Brink AATP, Snijders PJF, Walboomers JMM, Van der Waal I Meyer CJ (2000) No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 86:356–361.
 17. Hammerschmidt W, Sugden B (2004) Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. *Trends Mol Med* 10:331-336.
 18. Gulley ML, Tang W (2008) Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10:279-292.
 19. Imai S, Nishikawa J, Takada K (1998) Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 72:4371-4378.
 20. Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G (1992) Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 30:987–992.
 21. Tsang NM, Chang KP, Lin SY, Hao SP, Tseng CK, Kuo TT, Tsai MH, Chung TC (2003) Detection of Epstein-Barr virus–derived latent membrane protein-1 gene in various head and neck cancers: is it specific for nasopharyngeal carcinoma? *Laryngoscope* 113:1050–1054.
 22. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Ohishi M, Sakai H (1999) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189:34-39.
 23. Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J (2004) Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 33:30-36.

24. Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Diaz JM, Gavaldá C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres Puente M, Pérez Alonso M (2008) Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13:110-113.
25. Szkaradkiewicz A, Kruk-Zagajewska A, Wal M, Jopek A, Wierzbicka M, Kuch A (2002) Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med* 2:137-141.
26. González-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A (2002) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 112:482–487.
27. Ren Q, Zuo T, Lü H (2004) Malignant transformation of a human oral squamous cell carcinoma cell strain OSC-19 by EBV encoded small RNAs. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 18:675-680.
28. Shamaa AA, Zyada MM, Wagner MM, Awad SS, Osman MM, Azeem AAA (2008) The significance of Epstein Barr virus (EBV) & DNA Topoisomerase II α (DNA-Topo II) immunoreactivity in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia (OED) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Diagn Pathol* 3:45.
29. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC, Lyon.
30. Sobin LH, Wittekind CH (1997) Head and neck tumours. In: Sobin LH, Wittekind CH, editors. TNM: classification of malignant tumours. Wiley-Liss, New York, pp.20-24.
31. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta A (1998) Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from India. *J Oral Pathol Med* 27:78-82.
32. González-Moles M, Guitierrez J, Ruiz I, Fernandez J, Rodriguez M, Aneiros J (1998) Epstein-Barr virus and oral squamous cell carcinoma in patients without HIV infection: viral detection by polymerase chain reaction. *Microbios* 96:23-31.
33. van Heerden WE, van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Raubenheimer EJ (1995) Prevalence of EBV in oral squamous cell carcinomas in young patients. *Anticancer Res* 15:2335-2339.
34. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS (2004) Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 33:525–532.

35. Tsuchiko K, Nakazato I, Miyagi J, Iwamasa T, Arasaki A, Hiratsuka H, Sunakawa H, Kohama G, Abo T (2000) Comparative study of oral squamous cell carcinoma in Okinawa, Southern Japan and Sapporo in Hokkaido, Northern Japan: with special reference to human papilloma virus and Epstein-Barr virus infection. *J Oral Pathol Med* 29:70-79.
36. Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Tsai CH, Wong EFC, Lin SJ Yang CC (2004) Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan. *Jpn J Clin Oncol* 34:176–183.
37. Maeda T, Hiranuma H, Matsumura S, Furukawa S, Fuchihata H (1998) Epstein-Barr virus infection and response to radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 125:25–30.
38. Wei WI, Kwong DLW (2010) Current management strategy of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Esp Otorhinolaryngol* 3:1-2.

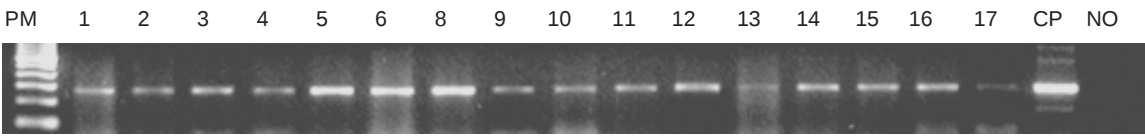


Figura 1 – Fotografia do gel de agarose 3% mostrando resultado da amplificação do gene da betaglobina humana (268 pb) por PCR de amostras de carcinoma espinocelular oral. PM = peso molecular de 100 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de sangue humano); NO = controle negativo (sem DNA).

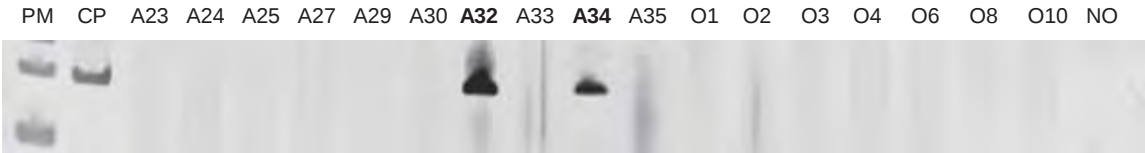


Figura 2 - Fotografia do gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de amostras de carcinoma espinocelular oral (amostras A32 e A34 positivas). PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA)

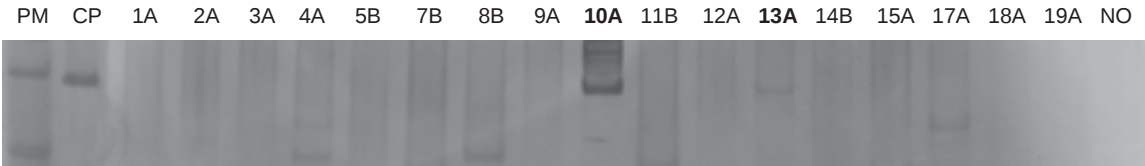


Figura 3 – Fotografia do gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR de amostras de mucosa oral clinicamente saudável (amostras 10A e 13A positivas). PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA).

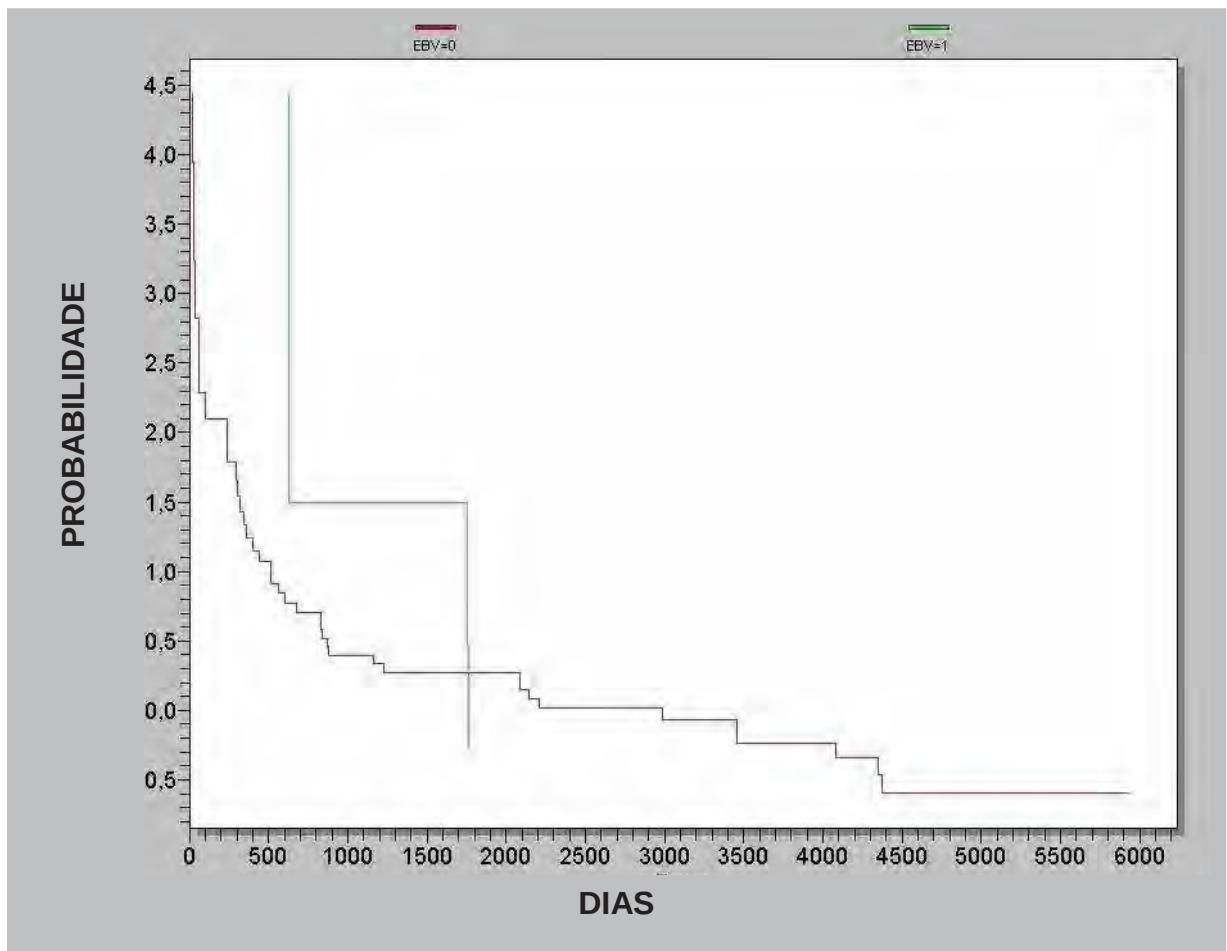


Figura 4 – Curva de probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma espinocelular segundo a presença ou não do EBV, pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,7$).

Quadro 1 – Detecção de EBV em CEC oral.

Autores	País	métodos	EBV positivo
Mao <i>et al.</i> , 1993	Inglaterra	PCR	35%
D’Costa <i>et al.</i> , 1998	Índia	PCR, Southern blot hybridization	25%
González-Moles <i>et al.</i> , 1998	Espanha	PCR	17,59%
Maeda <i>et al.</i> , 1998	Japão	PCR	64,4%
Kobayashi <i>et al.</i> , 1999	Japão	Southern blot, hybridization	15,2%
Sand <i>et al.</i> , 2002	Suécia	nPCR	37,9%
Gonzalez-Moles <i>et al.</i> , 2002	Espanha	PCR	19,2%
Bagan <i>et al.</i> , 2008	Espanha e Inglaterra	nPCR	40%
Kis <i>et al.</i> , 2009	Hungria	PCR	73,8%
Arêde <i>et al.</i> , 2010	Brasil	nPCR	9,75%

Tabela 1 – Comparação entre a presença de EBV nas três diferentes regiões avaliadas e no grupo controle.

Localização	pacientes	EBV + (%)	EBV - (%)	p*
assoalho bucal	20	2 (10,0)	18 (90,0)	0,95
controle	19	3 (15,8)	16 (84,2)	
língua	25	3 (12,0)	22 (88,0)	0,94
controle	19	3 (15,8)	16 (84,2)	
orofaringe	12	0	12 (100,0)	-
controle	19	3 (15,8)	16 (84,2)	

*Teste de proporção com Qui-quadrado

Tabela 2 - Correlação da presença do EBV com as variáveis clínico-patológicas e fatores de risco dos pacientes com carcinoma espinocelular oral.

Variáveis	pacientes (n= 57)	EBV + (n= 5)	EBV – (n=52)	p*
localização				0,47
assoalho bucal	20	2	18	
língua	25	3	22	
orofaringe	12	0	12	
sexo				0,62
masculino	52	5	47	
feminino	5	0	5	
idade				0,98
≤ 45	13	1	12	
entre 45 e 65	32	3	29	
≥ 65	12	1	11	
tabagismo				0,76
tabagista	54	5	49	
não tabagista	3	0	3	
etilismo				0,64
etilista	43	4	39	
abstêmio	14	1	13	
estadiamento clínico				0,32
I e II	23	3	20	
III e IV	34	2	32	
gradação histológica				0,38
<i>in situ</i> e bem diferenciado	5	1	4	
moderadamente e pouco diferenciado	52	4	48	
metástase cervical				0,32
negativo	27	3	24	
positivo	14	2	12	
não realizado	16	0	16	

*teste exato de Fisher ou Qui-quadrado

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOA – Unesp.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
Campus de Aracatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-

OF. 046/2008
CEP
SFCD/bri

Aracatuba, 30 de abril de 2008.

Referência Processo FOA 2008-00940

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **"DETECÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR EM PACIENTES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E MUCOSA NORMAL."** 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 29/04/2009 e o relatório final em 29/04/2010.

[Assinatura]
Prof. Dr. Stefan Furtz de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. GLAUCO ISSAMI MIYAHARA
Aracatuba-SP

Ciente. De acordo.

[Assinatura]
0908/08

[Assinatura]
Dr. Glauco Issami Miyahara

Anexo B – Normas da revista Clinical Oral Investigations.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

A) Title Page

1) The title page should include:

- O The name(s) of the author(s)
- O A concise and informative title
- O The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- O The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

2) Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

3) Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

B) Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- a. Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- b. Use italics for emphasis.
- c. Use the automatic page numbering function to number the pages.
- d. Do not use field functions.
- e. Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- f. Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- g. Use the equation editor or MathType for equations.
 - Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- h. Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- i. Word template
 - Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- j. LaTeX macro package
 - Headings
- k. Please use no more than three levels of displayed headings.
 - Abbreviations
 - Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.
 - Footnotes
 - Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.
 - Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

• Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively.

- O Journal article
 - Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
 - Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
 - Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 341:325–329
- O Article by DOI
 - Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086
- O Book
 - South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
- O Book chapter
 - Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- O Online document
 - Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- O Dissertation
 - Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

0

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

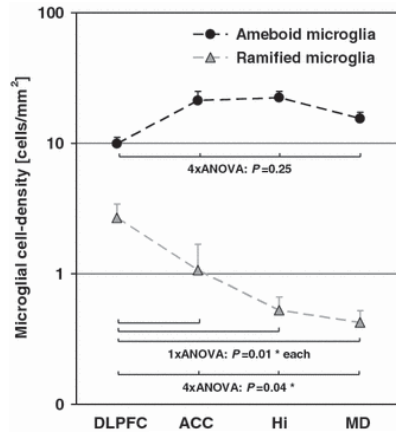
- 0 All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- 0 Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- 0 For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- 0 Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- 0 Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

- For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

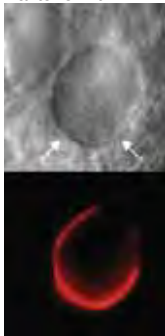
- 0 Supply all figures electronically.
- 0 Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- 0 For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- 0 Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- 0 Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



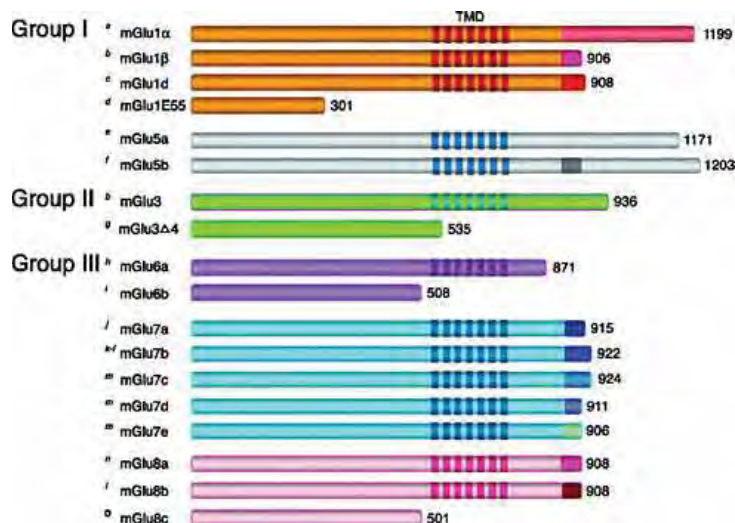
- 0 Definition: Black and white graphic with no shading.
- 0 Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- 0 All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- 0 Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- 0 Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- 0 Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- 0 If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- 0 Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
 - Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
- Color Art
 - Color art is free of charge for online publication.
 - If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
 - If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
 - Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).
- Figure Lettering
 - To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
 - Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
 - Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
 - Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
 - Do not include titles or captions within your illustrations.
- Figure Numbering
 - All figures are to be numbered using Arabic numerals.
 - Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
 - Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
 - If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.
- Figure Captions
 - Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
 - Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
 - No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
 - Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
 - Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.
- Figure Placement and Size
 - When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
 - For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
 - For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- ☐ Supply all supplementary material in standard file formats.
- ☐ Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- ☐ To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- ☐ Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- ☐ Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- ☐ A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- ☐ Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- ☐ If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- ☐ Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- ☐ It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- ☐ If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- ☐ Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- ☐ Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- ☐ For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- ☐ Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- ☐ The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- ☐ Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- ☐ Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Artwork – pegar no site

- Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.
If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

- **AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

O Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures.

Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Anexo C – Ficha clínica individual.

Pesquisa: Detecção do vírus Epstein-Barr em carcinoma espinocelular oral e mucosa oral na região de Araçatuba – SP, Brasil

mestranda: Livia Trevelin Arêde

Nome do paciente:

Número do caso:

Número do prontuário:

1. Sexo: (M) masculino (F) feminino
2. Idade do diagnóstico
 - 1) ≤ 45 anos
 - 2) Entre 45 e 65 anos
 - 3) ≥ 65 anos
3. Tabagista (+) sim (-) não
4. Etilista (+) sim (-) não
5. Estadiamento clínico
 - 1) I e II
 - 2) III e IV
6. Gradação histológica
 - 1) Carcinoma *in situ* e bem diferenciado
 - 2) Carcinoma moderadamente e pouco diferenciado
7. Metástase cervical
 - (-) negativo
 - (+) positivo
 - Não realizado
8. Condição final
 - 0) Vivo e morte não câncer
 - 1) Morte por câncer

Anexo D – Informações sobre os casos estudados.

localização	admissão	sexo	idade do diagnóstico	tabagista	etilista	estadiamento clínico	gradação histológica	esvaziamento cervical	EBV	último contato	estado atual
assoalho bucal	28/05/1991	M	59	+	+	2	1	–	–	2/9/1993	1
assoalho bucal	05/07/1995	M	63	+	+	2	1	–	–	20/11/1997	1
assoalho bucal	26/02/1996	M	74	+	+	2	1	–	–	30/4/2004	1
assoalho bucal	25/11/1996	M	64	+	+	1	1	–	–	20/9/1999	0
assoalho bucal	04/03/1997	M	63	+	+	1	1	–	–	12/1/2003	1
assoalho bucal	22/06/1998	M	56	+	–	2	1	+	–	15/6/1999	1
assoalho bucal	26/04/1999	M	58	+	–	1	1	–	–	12/10/2008	1
assoalho bucal	14/03/2000	M	42	+	+	1	1	–	–	22/2/2010	0
assoalho bucal	21/06/2001	M	77	+	–	2	1	não realizado	–	26/4/2003	1
assoalho bucal	20/8/2001	M	57	+	–	1	2	+	–	3/12/2003	1
assoalho bucal	30/04/2002	M	61	+	+	2	1	–	–	10/3/2010	0
assoalho bucal	14/06/2002	M	65	+	+	2	1	não realizado	–	8/7/2002	1
assoalho bucal	24/6/2002	M	55	+	+	1	1	–	–	10/3/2008	1
assoalho bucal	9/12/2002	M	47	+	+	1	1	não realizado	–	10/3/2010	0
assoalho bucal	24/6/2003	M	47	+	+	1	1	–	–	25/10/2005	0
assoalho bucal	10/05/2004	M	61	+	+	1	1	–	–	21/7/2007	1
assoalho bucal	18/10/2004	M	61	+	+	2	1	–	+	27/7/2009	0
assoalho bucal	18/10/2004	F	77	+	–	1	1	–	–	9/3/2010	0
assoalho bucal	05/10/2005	M	45	+	–	1	1	–	+	26/6/2007	1

assoalho bucal	25/5/2005	M	53	+	-	2	1	-	-	14/12/2009	0
língua	4/3/1993	F	63	+	+	2	2	-	-	24/6/2008	0
língua	30/8/1993	M	68	+	-	2	2	não realizado	-	27/4/1994	1
língua	20/12/1993	M	64	+	+	2	2	+	-	15/10/2000	0
língua	7/12/1993	M	57	+	+	1	2	-	-	10/3/2010	0
língua	20/6/1994	M	59	+	-	2	2	não realizado	-	14/4/1995	1
língua	11/8/1994	M	42	+	+	1	2	não realizado	-	6/4/1996	1
língua	20/3/1995	F	65	+	-	1	2	-	-	22/2/2010	0
língua	10/5/1995	M	48	+	+	2	2	+	-	29/4/2007	1
língua	12/2/1996	M	43	+	+	2	2	não realizado	-	21/3/1996	1
língua	13/5/1996	M	43	+	+	2	2	+	-	24/4/1997	1
língua	27/5/1996	M	34	+	+	2	2	+	-	25/3/1997	1
língua	9/9/1996	M	46	+	+	2	2	-	-	26/2/2006	1
língua	19/8/1996	M	56	+	+	2	2	+	+	15/6/2001	1
língua	25/11/1996	M	44	+	+	2	2	não realizado	-	26/1/1997	1
língua	21/7/1997	M	31	+	+	2	2	não realizado	-	27/10/1997	1
língua	2/3/1998	M	35	+	+	1	2	+	-	27/7/2009	0
língua	28/11/1998	M	63	+	+	2	2	não realizado	-	25/7/1999	1
língua	23/11/1998	M	66	+	+	1	2	não realizado	-	21/4/2000	1
língua	24/5/1999	F	82	-	-	2	2	+	-	9/12/2000	
língua	11/11/1998	F	63	-	-	2	2	-	-	10/1/2010	1
língua	5/12/1994	M	71	+	+	1	2	-	+	27/9/1999	1

língua	7/5/1991	M	43	+	+	1	2	-	-	27/5/1997	1
língua	15/12/1992	M	62	+	+	1	2	+	+	22/1/2009	1
língua	4/3/1996	M	54	+	+	1	2	+	-	22/5/1997	1
língua	12/2/1996	M	47	-	+	1	2	-	-	18/1/2010	0
orofaringe	17/8/1993	M	44	+	+	2	2	-	-	25/12/1996	1
orofaringe	13/12/1993	M	57	+	+	2	2	-	-	11/5/1996	1
orofaringe	25/5/1994	M	71	+	+	2	2	não realizado	-	22/6/1994	1
orofaringe	8/8/1994	M	53	+	+	2	2	não realizado	-	4/10/1994	1
orofaringe	19/6/1995	M	42	+	+	1	2	-	-	27/7/1996	1
orofaringe	11/9/1995	M	84	+	-	2	2	não realizado	-	7/2/1997	1
orofaringe	2/3/1998	M	57	+	+	2	1	não realizado	-	15/11/2003	1
orofaringe	5/1/1998	M	47	+	+	2	2	+	-	22/11/1998	1
orofaringe	14/5/2001	M	75	+	-	2	2	não realizado	-	13/3/2002	0
orofaringe	4/11/1993	M	54	+	+	1	2	-	-	1/10/2005	1
orofaringe	17/3/1998	M	42	+	+	2	2	+	-	22/6/2000	1
orofaringe	15/7/2003	M	59	+	+	2	2	+	-	9/11/2009	0

Anexo E – Programação de ciclos do termociclador para a nPCR, primeira e segunda etapa da nPCR para o EBV.

Etapa	temperatura	tempo	ciclos
desnaturação inicial	94°C	2 minutos	1
desnaturação	94°C	30 segundos	
anelamento	55°C	30 segundos	
extensão	72°C	30 segundos	35
extensão final	72°C	5 minutos	1

Anexo F – Análise estatística (p*) entre a presença do EBV e as variáveis para cada localização anatômica do CEC.

variáveis	assoalho bucal	língua	orofaringe
sexo	0,9	0,5783	-
estadiamento clínico	0,7105	0,3457	0,4222
tabagismo	-	0,6696	-
etilismo	0,5895	0,4957	0,6104
gradação histológica	0,3684	-	-
metástase cervical	0,6905	0,371	-

*Teste exato de Fisher

Anexo G – Região BamHIW do EBV e fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos na nPCR.

GGATCCCCCACCAGGCCCTTCTCTGTCCCCCTGCTCCTCTCCAACCTTCGCTCCACCCTAGACCCAGCTTCTGGCCTC
CCCGGGTCCACCAGGCCAGCCGGAGGGACCCCGGCAGCCCGGGCGAGTCGCCTTCCCTCTCCCCTGGCCTCTCCTTCCC
GCCTCCCACCCGAGCCCCCTCAGCTTGCTCCCCACCGGGTCCATCAGGCCGGCCGGAGGGACCCCGGCGGCCCGGTG
TCAGTCCCCCTGCAGCCGCCAGTCTCTGCCTCCAGGCAAGGGCGCCAGCTTTTCTCCCCCAGCCTGAGGCCAGGC
TCCTGTGCACTGTCTGTAAAGTCCAGCCTCCCACGCCCCTCCACGGCTCCCGGGCCAGCCCCGTCCACCCCTCCCCACG
GTGGACAGGCCCTCTGTCCACCCGGGCCATCCCCGCCCCCTGTGTCCACCCAGTCCCGTCCAGGGGGGACTTTATGT
GACCCTTGGGCTGGCTCCCCATAGACTCCCATGTAAGCCTGCCTCGAGTAGGTGCCTCCAGAGCCCCCTTTGCCCCCT
GGCGGCCAGCCCGACCCCGGGCGCCCCCAAACCTTTGTCCAGATGTCCAGGGTCCCCGAGGGCGAGGCCAGCCCC
CTCCCGCCCTGTCCACTGCCCCGGTCCCCCAGAAGCCCCAAAAGTAGAGGCTCAGGCCATGCGCGCCCTGTACCA
GGCCTGCCAAAGAGCCAGATCTAAGGCCAGGAGAGGCAGCCCCAAAGCGGGTGCAGTAACAGGTAATCTCTGGTAGTGAT
TTGGACCCGAAATCTGACACTTTAGAGCTCTGGAGGACTTTAAACTCTAAAAATCAAACTTTAGAGGCGAATGGGCGCCA
TTTTGTCCACGCGCGCATAATGGCGGACCTAGGCCTAAAACCCCCAGGAAGCGGGTCTATGGTTGGCTGCGTGCTGC
TATCTTTAGAGGGGAAAAGAGGAATAAGCCCCAGACAGGGGAGTGGGCTTGTGTGACTTCACCAAAGGTCAGGGCCC
AAGGGGGTTGCGCTTGCTAGGCCACCTTCTCAGTCCAGCGCTTTACGTAAGCCAGACAGCAGCCAATTGTGAGTTCTAG
GGAGGGGGACCACTGCCCCCTGGTATAAAGTGGTCTGCAGCTATTTCTGGTCGCATCAGAGCGCCAGGAGTCCACAAAA
TGTAAGAGGGGGTCTTCTACCTCTCCCTAGCCCTCCGCCCCCTCCAAGGACTCGGGCCCAGTTTCTAACTTTTCCCCTTC
CCTCCCTCGTCTTGCCCTGCGCCCGGGGCCACCTTCATCACCGTCGCTGACTCCGCCATCCAAGCCTAGGGGAGACCGA
AGTGAAGTCCCTGGACCAGCCCGGCCCGGGCCCCCGGTATCGGGCCAGAGGTAAGTGGACTTTAATTTTTTCTGCTAA
GCCAACACTCCACCACACCCAGGCACACACTACACACACCCACCCGCTCTCAGGGTCCCTCGGACAGCTCCTAAGAAG
GCACCGGTGCGCCAGTCTACCAAGAGGGGGCCAAGAACCAGACGAGTCCGTAGAAGGGTCTCTGTCAGCAAGAAGAG
GAGGTGGTAAGCGGTTACCTTCAGGGGTAAGTAACCTGACCTCTCCAGGGCTCACATAAAGGGAGGCTTAGTATACATGC
TTCTTGCTTTTACAGGAACCTGGGGGCTAGTCTGGGTGGGATTAGGCTGCCTCAAGTTGCATCAGCCAGGGCTTCATGCC
CTCCTCAGTTCCCTAGTCCCCGGGCTTCAGGCCCCCTCCGTCCCCGTCTCCAGAGACCCGGGCTTCAGGCCCTGCCTCT
CCTGTTACCCTTTTAGAACACAGCCTGGACACATGTGCCAGACGCTGGGCTCTAAGGCCCTCGGGTCCCCCTGGACC
CCGGCTCAGCAACCCTGTGCTCCCATCCTGCCACCCAGCCTCCCCCTCCCCGTCCCCCTTCGCTCCTGATCCTCC
CCCGGTCCCCAGTAGGGCCGCTGCCCCCTGCACCCAGTACCTGCCCTCTTGCCACGCACCCCGGGCCAGGCCACC
TTAGACCCGGCCAAGCCCCATCCCTGAAGACCCAGCGGCCATTCTCTGTGTAACGAGCAGAGAAGAAGTAGAGGCCCGC
GGCCATTGGGCCAGATTGAGAGACCAGTCCAGGGGCCCGAGGTTGGAGCCAGCGGGCACCCGAGGTCCCAGCACCCG
GTCCCTCCGGGGGGCAGAGACAGGCAGGGGCCCGCCGAGCTGGCCCCGAGGAGGCGCCCGAGTGGGGCCGGTCTG
GCTGGGCTGGCCGAGCCCGGGTCTGGGAGGTCTGGGTGGCGAGCCTGCTGTCTCAGGAGGGGCTGGCTCCGCCGG
GTGGCCCTGGGGTACGTCTGGGAGGCAGAGGTCGGCCTAGGCCCGGGGAAGTGGAGGGGGATCGCCCGGTCTCTGT
TGGCAGAGTCCGGGCGATCCTCTGAGACCCTCCGGGCCCGGACGGCCGCCCTCAGCCCCCAGACAGACCCAGGGTC
TCCAGGCAGGGTCCGGCATCTCCAGGGGCAGCAGGCTCACCACCACAGGCCCCCCAGACCCGGGTCTCGGCCAGCCGA
GCCGACCGGCCCGCGCCGGGCGCCTCCTCGGGGCCAGCCGCGGGGTTGGTTCTGCCCTCTCTGTCTTCTCAGAG
GAACCAGGGACCTCGGGCACCCAGAGCCCCCTCGGGCCCGCCTCCAGGCGCCCTCCTGGTCTCCGCTCCCCTCTTAGCC
CCGTAAACCCAAAGAATGTCTGAGGGGAGCCACCCTCGGGGCCAGGCCCCAGAGTCCAGAGGTCAGGGGCACCTCAG
GGTGCCTCCCCGGTCCCAGGCCAGCCGGAGGGACCCCGGCAGCCCGGGCGGCCCCAGAGGCCGGTTCCTCGCCCCCT
CCCCGGGCTTCAGAGCCCAGGATGTCCCCCAGAAGGGACCTAGGCGTCCCCTCTCCTCCCCTCCAGGCTCGAGCCTCT
CCCTCGCGGAGAGGGGCTCTTTGGGCCCTCACGTCCAGCCCCACCGAGACCCGAGTGGCC

Oligonucleotídeos externos

GAGACCGAAGTGAAGTCCCTGGACCAGCCCGGCCCGGGCCCCCGGTATCGGGCCAGAGGTA
AGTGGACTTTAATTTTTTCTGCTAAGCCCAACACTCCACCACACCCAGGCACACACTACACACAC
CCACCCGTCTCAGGGTCCCCTCGG**ACAGCTCCTAAGAAGGCACC**

Oligonucleotídeos internos

GCCAGAGGTAAGTGGACTTTAATTTTTTCTGCTAAGCCCAACACTCCACCACACCCAGGCACACA
CTACACACACCC**ACCCGTCTCAGGGTCCCCTC**