

Gláucia Resende Soares

Correlação da presença do papilomavírus humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de orofaringe. Análise de sobrevida.

Araçatuba – SP

2011

Gláucia Resende Soares

Correlação da presença do papilomavírus humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de orofaringe. Análise de sobrevida.

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: Glauco Issamu Miyahara

Co-orientador: Eder Ricardo Biasoli

Araçatuba – SP

2011

Agradecimentos

À minha família por proporcionar a realização de um sonho.

Ao Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara pela oportunidade, paciência e disposição para ensinar sempre!

À equipe do meu orientador, por ser composta por pessoas acessíveis e dispostas a repassar conhecimentos necessários para realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência”. **Henry Ford**

Soares GR. Correlação da presença do papilomavírus humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de orofaringe. Análise de sobrevida [monografia]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Resumo

O papilomavírus humano (HPV) faz parte da família *papillomaviridae*, é considerado a principal causa do câncer de colo de útero e avalia-se o papel do vírus em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Já o vírus Epstein-Barr (EBV) é um membro da família dos herpes vírus humanos com cerca de 90% da população mundial adulta infectada, sendo altamente associado a alguns tipos de câncer e à imunossupressão. Apesar do aprimoramento das técnicas de detecção dos vírus nas lesões de mucosa bucal, a sua relação direta com os carcinomas orais ainda não foi totalmente comprovada. O propósito deste estudo foi investigar a presença do HPV e EBV em carcinoma espinocelular de orofaringe e verificar sua influência na sobrevida dos pacientes estudados. A detecção dos vírus foi realizada com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 37 amostras parafinadas de carcinoma espinocelular de orofaringe, sendo encontradas 12 (32,4%) amostras que apresentaram o HPV positivo, 3 (8,1%) EBV positivo e nenhuma amostra continha os dois DNA virais. Os resultados foram submetidos a análises estatísticas (Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher) e para análise da sobrevida foi aplicado o Teste de Kaplan Meier. Não houve significância estatística entre as variáveis analisadas. A não correlação da presença do HPV e do EBV sugere que estes vírus atuam de forma independente entre si no desenvolvimento do carcinoma espinocelular de orofaringe.

Palavras-chave: Vírus Epstein-Barr, Papilomavirus humano, carcinoma espinocelular, Reação em cadeia de polimerase

Soares GR. Correlation between human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in patients with oropharynx squamous cell carcinoma. Survival analysis [monografia]. Araçatuba: Sao Paulo State University, 2011.

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is considered the mainly etiologic factor of cervical cancer and his role in oropharynx squamous cell carcinoma is much studied. Epstein-Barr virus (EBV) affects 90% of the world population, being highly associated with some types of cancer and immunosuppression, however its direct relationship to oral carcinomas has not been fully proven. The aim of this study is to measure the presence of HPV and EBV in paraffin embedded samples obtained by biopsy of patients with oropharynx squamous cell carcinoma, correlate the presence of these viruses among themselves and each one in relation to survival. Virus detection was performed using the polymerase chain reaction (PCR) in 37 paraffin sample of oropharynx squamous cell carcinoma, and found 12 (32.4%) samples with HPV positive, three (8.1%) EBV positive and no samples contained the two viral ADN. The results were subjected to statistical analysis (chi-square or Fisher's exact test) and for the survival analysis was applied the test of Kaplan Meier. There was no statistical significance between the variables. The non-correlation of the presence of HPV and EBV suggests that these viruses act independently from each other in the development of squamous cell carcinoma of the oropharynx.

Keywords: Human Herpesvirus 4, Human papilloma, Carcinoma, Squamous Cell, Polymerase Chain Reaction

Sumário

1 Introdução	8
2 Revisão de Literatura	10
3 Objetivo	12
4 Metodologia	13
4.1 Extração de DNA	13
4.2 PCR para gene humano controle	13
4.3 PCR e nPCR para amplificação do HPV	15
4.4 PCR e nPCR para amplificação do EBV	16
4.5 Análise Estatística	17
5 Resultados	18
6 Discussão	20
7 Conclusão	22
Referências	23
Anexo	26

1 Introdução

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que em 2020 o número de novos casos de câncer seja de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam 14.120 mil novos casos para localização primária na boca, sendo a 7ª neoplasia maligna mais incidente. A previsão é que cerca de 7% da população mundial seja acometida pelo câncer de boca.

O carcinoma espinocelular corresponde a aproximadamente 90% de todas as neoplasias orais (Luo et al., 2007). Sua etiologia é multifatorial e entre os principais fatores de risco estão o consumo de fumo e a ingestão de bebidas alcoólicas (Herrero et al., 2003), sendo relatado na literatura um aumento de até 76% do risco de morte por câncer bucal de usuários da bebida alcoólica quando comparado a não bebedores, e o risco aumenta conforme a frequência e quantidade de bebida ingerida (Cancela et al., 2009). Por outro lado, cerca de 10% a 20% dos pacientes com câncer bucal não fumam e não bebem, sugerindo que outros fatores, incluindo certos vírus, dieta e má higiene oral possam ter implicação no processo de carcinogênese oral (Gillison & Shah, 2001; Chuang et al., 2008). Assim, o maior conhecimento da ação dos vírus no câncer bucal deve reduzir esta doença no mundo, pois dados recentes tem considerado essa etiologia (Wong M. et al., 2002; Goon et al., 2009).

O epitélio da cavidade oral e orofaringe apresentam propensão para o desenvolvimento neoplásico, sendo exposto a vários agentes carcinogênicos nutricionais e ambientais, determinantes de lesões decorrentes de efeitos da infecção pelo HPV e mutagênese química (Kreimer et al., 2005). O Epstein-Barr vírus infecta células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e linfócitos B e é altamente associado a alguns tipos de câncer e à imunossupressão (Lima et al., 2006). Sendo o mais potente vírus indutor de transformação e crescimento celular conhecido, capaz de imortalizar linfócitos B humanos (Macedo et al., 2003).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica bastante indicada para detectar o DNA desses vírus, pois é extremamente sensível e assim como a

captura híbrida são aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), podendo servir como padrão ouro para métodos de detecção do HPV (Zaravinos et al., 2009).

2 Revisão de literatura

Nos últimos 15 anos o papilomavírus humano (HPV) foi considerado a principal causa do câncer de colo de útero e tem sido relacionado com carcinomas espinocelular de cabeça e pescoço (Kreimer et al., 2005). Uma forte associação entre o câncer cervical e o oral com papilomavírus humano (HPV) de alto risco ressalta a importância do vírus na patogênese dos carcinomas espinocelular e sua contribuição na carcinogênese e progressão tumoral (Nair & Pillai, 2005).

O HPV está presente em até 60% dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe e confere um prognóstico favorável em termos de recorrência e mortalidade para câncer de cabeça e pescoço (Chuang et al., 2008; Goon et al., 2009). Em uma revisão sistemática sobre detecção de HPV, de 5.046 biópsias de casos de carcinomas espinocelular, (2.642 casos da cavidade oral, 969 casos de orofaringe e 1.435 casos de laringe) a maior prevalência de HPV positivo foi em carcinomas espinocelular de orofaringe (35.6%), seguida pela laringe (24%) e carcinomas orais (23.5%) (Kreimer et al., 2005).

A prevalência do HPV sofre considerável diferença quando analisados pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe (82%) e carcinoma espinocelular oral (13%) (Laco et al., 2011). A afinidade do HPV para essas áreas anatômicas podem ser explicadas pela produção de citocinas em dado momento pelos tecidos linfóide e / ou por invaginação profunda da superfície tonsilar e epitélio escamoso frouxo na base do criptas tonsilares, tornando-o mais suscetíveis à infecção pelo HPV (Löning et al., 1985).

O vírus Epstein-Barr (EBV) é o agente etiológico comprovado de carcinoma de nasofaringe e também está associado a leucoplasia pilosa, linfoma de Hodgkin e linfoma não- Hodgkin (Al Moustafa et al., 2009; Wong et al., 2002.). Vários autores já estudaram a possível implicação do EBV em carcinoma espinocelular oral, mas com resultados controversos (Iamaroon et al., 2004; Kis et al., 2009). Estudo preliminar sobre a presença do vírus Epstein-Barr em leucoplasia verrucosa proliferativa (PVL) e carcinoma espinocelular, identificou o vírus em ambas as lesões. Entretanto, detectaram EBV em maior porcentagem em PVL quando comparado aos casos de carcinoma espinocelular sem PVL prévio, não tiveram evidências de qualquer papel

direto na etiologia que pode ser uma simples infecção associada no contexto de um epitélio com múltiplas alterações severas por um longo período (Bagan et al., 2008).

Estudo comparativo entre pacientes com carcinoma espinocelular usuários e não usuários de um tipo de tabaco sudanês sem fumaça (toombak), obteve como resultado 39 (27%) das biópsias dos usuários toombak e 15 (21%) dos não-usuários eram HPV positivos; EBV foi encontrado em 53 (37%) das biópsias dos usuários toombak e 16 (22%) dos não-usuários. O estudo mostra que um paciente pode apresentar mais de um vírus e que este pode influenciar na saúde bucal e no desenvolvimento do câncer (Jalouli et al., 2010).

Estudo com acompanhamento de 274 pacientes com carcinoma oral primário obteve taxa de sobrevida dessa população de 80% em 12 meses, 60% em 24 meses, 46% em 36 meses, 40% em 48 meses, e 39% em 60 meses. A localização dos tumores com pior prognóstico foram assoalho da boca seguido pela língua, com taxas de sobrevida de 19% e 27%, respectivamente. Sessenta e cinco por cento dos carcinomas orais avaliados foram diagnosticados em estágios avançados (III e IV). Destacando-se, então, a importância de um diagnóstico precoce, seja por meio da promoção da saúde, da assistência aos pacientes, da vigilância, da formação de recursos humanos, da pesquisa, ou da comunicação e mobilização social, sempre com o objetivo de aumentar a sobrevida do paciente (Brandizzi et al., 2008).

Os principais fatores prognósticos para pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe são a infecção pelo HPV, estágio do câncer e a relação do paciente com o fumo do tabaco, por determinar o perfil molecular do câncer, podendo a partir dessas informações obter uma classificação de risco baixo, médio ou elevado de morte dos pacientes (Ang et al., 2010).

Apesar de o HPV e o EBV serem encontrados em lesões de câncer bucal, a exata participação carcinogênica nessa região não está completamente esclarecida, contudo Al Moustafa et al. (2009) propõe a hipótese de que as células epiteliais da mucosa oral normal são susceptíveis a infecção pelo HPV de alto risco e co-infecção pelo EBV, e que estes desempenhem um papel importante na iniciação de uma transformação neoplásica de células epiteliais, através de onco-proteínas do HPV e do EBV.

3 Objetivo

O propósito deste estudo foi investigar a correlação entre a presença dos vírus em carcinoma espinocelular de orofaringe e verificar sua influência na sobrevida dos pacientes estudados.

4 Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Processo nº 2008-00940. Foram utilizados os blocos de parafina de 37 amostras de pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe diagnosticados no Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

4.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA foram realizados inicialmente a remoção do excesso de parafina e posteriormente 5 a 10 cortes de 10µm de espessura de cada peça parafinada 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.

Os procedimentos de extração foram realizados sob condições estéreis por apenas um pesquisador. A extração do DNA foi realizada com o uso do QIAmp DNA minikit® (QIAGEN Ltd, Crawley, UK), conforme as instruções do fabricante.

O DNA obtido de ambos os materiais foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) para confirmação da quantidade e pureza das amostras do DNA, posteriormente foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene controle da β -globina humana, para o gene do HPV e para o gene do EBV.

4.2 PCR para gene humano controle

Para realização do PCR do gene controle da β -globina (268 pares de base - pb) foram utilizados os oligonucleotídeos GH20 (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) e PC04 (CAACTTCATCCACGTTTACC) (Invitrogen Life Technologies, Brasil).

A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, USA) adicionando-se ao DNA, com concentração padrão de 150 ng/dl, um mix com os seguintes componentes: 10,9 µl de água ultra-pura; 1,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (GH20 e PCO4) com concentração de 15 pmol ; 1U (0,1 µl) de Taq DNA polimerase, 2,5 µl de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl); 2 µl de MgCl₂ com 4 mM de concentração; 1,5 µl de dNTPs (deoxyribonucleoside 5'-triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 0,25 mM , com exceção da água ultra-pura e dos dNTPs, os demais componentes são da Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

Após a mistura dos componentes, em um fluxo-laminar (Heto-Holter Tivo HV PCR, Dinamarca), foi adicionado 5 µl do DNA de cada amostra, com concentração padrão de 150 ng/dl, totalizando um volume final de 25 µl. Como controle positivo para o gene da β-globina utilizou-se uma amostra de sangue previamente testada e como controle negativo uma amostra contendo somente o mix.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador (Peltier Effect Cycling modelo PTC – 100, MJ Research, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, com extensão final a 72° C por 8 minutos.

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

Após confirmado a presença e integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do gene do HPV e do EBV através de dois métodos: PCR e nPCR (nested Reação em cadeia de polimerase) com oligonucleotídeos iniciadores de cada um..

4.3 PCR e nPCR para amplificação do HPV

Na primeira etapa, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta técnica foram MY11(GCMCAGGGWCTATAAYAATGG) e MY09 (CGTCCMARRGGAWACTGATC) da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, para amplificar fragmentos da região tardia L1 do genoma viral, com 450 pares de bases (Szkaradkiewicz et al., 2002; Hansson et al., 2005).

Os componentes do mix para esta PCR foram: 10,9 µl de água ultra-pura; 2,5 µl de tampão de PCR 10X; 2 µl de MgCl₂ 50mM; 1,5 µl de dNTPs; 0,2 µl (2 U) de Taq polimerase e 1,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador nas mesmas concentrações descritas para o mix da betaglobina. Em fluxo laminar foram adicionados 5 µl de DNA genômico de cada amostra. Como controle positivo para infecção por HPV, foi utilizada uma amostra de HeLa, uma linhagem de células de carcinoma cervical uterino com até 4 cópias de HPV-18 por célula. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultra-pura.

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

Após a termociclagem foram separados 2 µl do produto obtido nesta primeira PCR para utilização na segunda etapa da nPCR. Sendo o restante dos produtos da PCR submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, durante 3 horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Na segunda etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC) e GP6+ (GAAAAATAAACTTGTAATCATATTC) da Invitrogen Life Technologies®, Brasil, cujo fragmento é de 150 pares de bases (HANSSON et al., 2005). A mistura de amplificação, os controles utilizados e as condições de ciclagem foram semelhantes às da primeira etapa, com diferenças na quantidade de água ultra-pura (13,9 µl) e na temperatura de anelamento (43°C).

Para verificação da presença do DNA do HPV foram utilizados 10 µl do produto da nPCR e 2 µl de corante brometo de etideo e foi feita a análise através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão 1x TBE (Fonte Eletroforética - Amersham pharmacia biotech modelo EP3501, Suécia), durante 3 horas a 100 volts. Após este período a evidenciação das bandas foi realizada com nitrato de prata e o gel foi fotografado sob transiluminação UV para documentação dos resultados.

4.4 PCR e nPCR para amplificação do EBV

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e na nPCR fazem parte da região BamHIW do EBV. Na primeira etapa (PCR) foram utilizados os oligonucleotídeo externo para frente – GAGACCGAAGTGAAGTCCCT e oligonucleotídeo externo para trás – GGTGCCTTCTTAGGAGCTGT, (Integrated DNA Technologies), utilizados a 10µM, que amplificam fragmento de 100 pares de bases (Kis et al., 2009).

Os componentes do mix para esta PCR foram: 2,5 µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM, pH8, KCl 50mM); 1,3 µl de MgCl₂ (4mM); 0,25 µl de dNTPs (0,2 mM); 0,5 µl de Taq polimerase (5 U); 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (20 pmol), 5 µl de amostra de DNA genômico e água ultrapura para totalizar o volume final de 50 µl. Como controle positivo para infecção por EBV, foi utilizada uma amostra de DNA extraído de tecido parafinado de um paciente com diagnóstico histopatológico de Linfoma de Hodgkin. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, com extensão final a 72° C por 5 minutos.

Após a termociclagem foram separados 1 µl do produto obtido nesta primeira PCR para utilização na segunda etapa (nPCR). O restante dos produtos da PCR 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 em

solução de nitrato de prata e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Na segunda etapa foram substituídos os oligonucleotídeos iniciadores externos pelos internos da Invitrogen Life Technologies® (oligonucleotídeos interno para frente - GCCAGAGGTAAGTGGACTTTAAT e oligonucleotídeo interno para trás – GAGGGGACCCTGAGACGGGT) que amplificam um fragmento de 100 pb dentro da sequência do fragmento amplificado na primeira etapa. A mistura de amplificação, os controles utilizados e as condições de ciclagem foram semelhantes às da primeira etapa, exceto pela substituição dos oligonucleotídeos já mencionados.

Os produtos da nPCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida sob as mesmas condições da técnica de PCR e após evidenciação foi realizada a documentação.

4.5 Análise estatística

Foi investigado a existência de associação entre os dois vírus estudados pela aplicação de testes estatísticos (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 dos vírus pelo método de Kaplan-Meier, foi realizada com aplicação do teste Log-Rank, com nível de significância de 5%.

5 Resultados

As amostras de DNA extraído continham entre 150 e 300ng/μl e foram testadas para amplificação de parte do gene da betaglobina humana (Figura 1). Após a confirmação da presença do gene humano, as amostras foram submetidas à detecção do HPV e do EBV como pode ser visualizado na Figura 2. A presença do DNA do EBV foi de 8,1% (3 em 37) e de 32,4% (12 em 37) para o HPV.

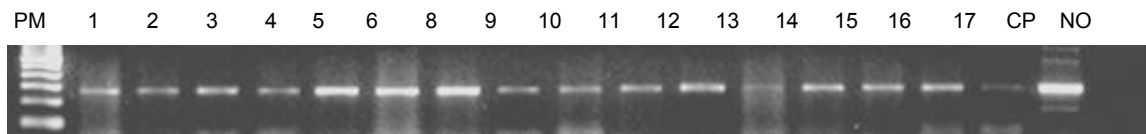


Figura 1 – Fotografia do gel de agarose 3% mostrando resultado da amplificação do gene da betaglobina humana (268 pb) por PCR de amostras de carcinoma espinocelular oral.

PM = peso molecular de 100 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de sangue humano); NO = controle negativo (sem DNA).

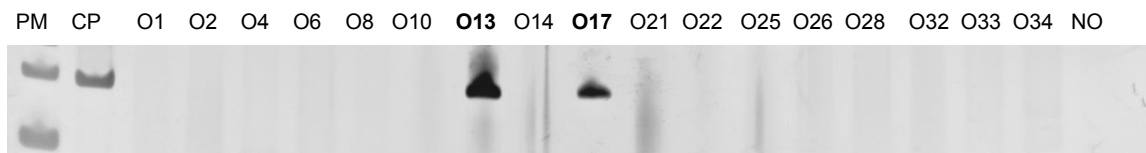


Figura 2 - Fotografia do gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do EBV (100 pb) por nPCR do grupo experimental.

PM = peso molecular de 50 pb; CP = controle positivo (DNA extraído de linfoma de Hodgkin); NO = controle negativo (sem DNA)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com e sem o vírus em pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe (Tabela 1).

Variável	Pacientes (n=37)	HPV	EBV	p*
<u>Vírus</u>				0,37
Presente (+)	15	12	3	
Ausente (-)	22	25	34	

Tabela 1 – Tabela correlacionando a presença e ausência dos vírus.

*teste exato de Fisher ou Qui-quadrado

O teste Log-Rank, que compara as curvas de probabilidade acumulada de sobrevida com a presença ou ausência dos vírus (Gráfico 1), também não apresentou significância estatística ($p = 0,83$).

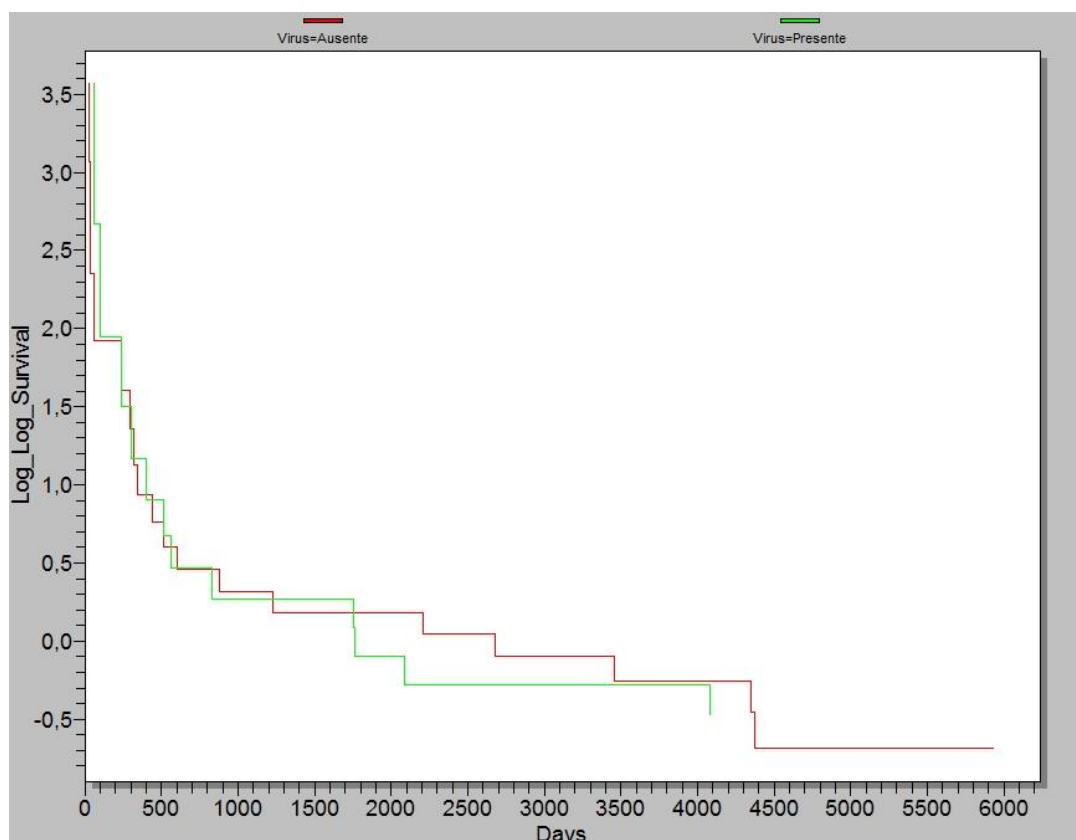


Gráfico 1 – Análise de sobrevida dos pacientes com e sem a presença dos vírus pelo método Kaplan-Meier, através do teste de Log-Rank.

6 Discussão

Muitos autores indicam as infecções virais pelo HPV e EBV como um fator etiológico em casos de carcinoma espinocelular oral. Apesar de Chuang et al. (2008) considerar que a presença de certos vírus possa explicar a existência de pacientes com câncer bucal que não fumam e não bebem, outros autores já acreditam que a presença dos vírus em lesões malignas pode ser puramente casualidade ou serem ativados como consequência de um processo carcinogênico, concluindo que somente a infecção viral não é suficiente para o desenvolvimento desta patologia (Sand et al., 2002; Szkaradkiewicz et al., 2002; Iamaroon et al., 2004; Kis et al., 2009), da mesma forma que foi constatado em nossos resultados.

Kis et al. (2009) em seu estudo na Hungria avaliou a prevalência do EBV em 65 pacientes com carcinoma espinocelular oral, sendo observado a presença do vírus em 73,8% através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tecido parafinizado, já Bagan et al. (2008) encontrou em 40% de suas amostras a presença do vírus em técnica de nested PCR, em nosso estudo também foi aplicado a nested PCR sobre o mesmo tipo de amostra e observado em apenas 8,1% dentre os 37 avaliados.

Kreimer et al. (2005) relata ter encontrado a maior prevalência de HPV positivo em carcinoma espinocelular de orofaringe (35.6%) com uso da técnica de PCR, já Ang et al. (2010) observou 63,8% de pacientes HPV-positivo com carcinoma espinocelular de orofaringe em uma amostra de 323 casos, utilizando a técnica de hibridização. Em nosso estudo encontramos resultados semelhantes ao primeiro, pois observamos 32,4% de amostras positivas para o vírus em mesma localização, com uso da nested PCR.

Assim como Luo et al. (2007) e Bagan et al. (2008) consideramos esta discrepância na presença dos vírus nos estudos mencionados, devido a região geográfica em que foi realizada a pesquisa, aos métodos utilizados para a coleta e armazenamento da peça, técnica empregada e também a localização da lesão.

Alguns estudos apontam uma melhora no prognóstico do carcinoma espinocelular de orofaringe devido a presença do HPV (Chuang et al., 2008; Ang et

al.,2010), porém, assim como Brandizzi et al. (2008), acreditamos que o principal fator envolvido é o diagnóstico precoce, ou seja, a descoberta da lesão em estágio inicial, possibilitando tratamentos menos invasivos.

Jalouli et al. (2010) em seu estudo avalia a presença dos dois vírus (HPV e EBV) em conjunto de pacientes saudáveis e de pacientes com carcinoma espinocelular oral, sendo a maior prevalência observada em pacientes com a mucosa normal 41,7% (73/175), e de 13% (8 / 62) para pacientes com a lesão. Em nosso estudo não foi observado nenhum caso em que houvesse a presença dos dois vírus. cremos que os vírus estão cada vez mais presentes nos seres humanos, devido aos novos hábitos de vida que incluem aumento de parceiros sexuais, levando a transmissão dos dois vírus, seja através da saliva ou do ato em si, já a menor taxa do vírus em pacientes com câncer corrobora ao fato do vírus não ser o principal fator desencadeador de todo processo carcinogênico, e sim apresentar uma ação sinérgica ao demais fatores já mencionados.

Ang et al. (2010) citam que as taxas de sobrevida de 5 anos entre os pacientes com tumores HPV-positivos é de cerca de 75 a 80%, contra 45 a 50% entre os pacientes com tumores HPV-negativos. Kis et al. (2009) relata a falta de influência na sobrevida de acordo com a presença do EBV, não atuando no prognóstico de forma positiva nem negativa. Em nosso estudo não conseguimos resultado estatisticamente significativo sobre a influência da presença dos vírus na sobrevida do paciente, tendo como possível explicação o número reduzido de pacientes avaliados.

7 Conclusão

De acordo com a metodologia utilizada neste trabalho, a presença do HPV e EBV em carcinoma espinocelular de orofaringe não apresentou alteração estatisticamente significativa na sobrevida do paciente, entretanto devemos levar em consideração as limitações do projeto quanto ao número de pacientes avaliados, assim como o meio de conservação das peças (parafina) o que já degrada o DNA, então possivelmente teríamos maior precisão na detecção dos vírus se avaliados em tecido fresco.

Referências

- AL MOUSTAFA, A.E. et al. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. **Med Hypotheses**, 73(2):184-6, 2009.
- ANG, K.K. et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. **N Engl J Med**; 363(1): 24-35, 2010.
- BAGAN, JV et al. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 13(2):110-3, 2008.
- BRANDIZZI, D. et al. Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**; 13:544–8, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2010**. Rio de Janeiro. INCA, 2010.
- CANCELA, Mde.C. et al. Alcohol intake and oral cavity cancer risk among men in a prospective study in Kerala, India. **Community Dent Oral Epidemiol.**; 37(4):342-9, 2009.
- CHUANG, A.Y. et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, 44(10):915-9, 2008.
- GILLISON, M.L.; SHAH, K.V. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. **Current Opinion in Oncology**, 13:183-8, 2001.

GOON, P.K. et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head Neck Oncol.**, 14(1):36, 2009.

HANSSON, B.G. 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 Oto-Laryngologica**, 125:1337-1344, 2005.

HERRERO ET AL. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **Journal of National Cancer Institute**; 95(23):1772–83, 2003.

IAMAROON, A. et al. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.**; 33(1):30-6, 2004.

JALOULI, J. et al. Presence of human papilloma virus, herpes simplex virus and Epstein-Barr virus DNA in oral biopsies from Sudanese patients with regard to toombak use. **J Oral Pathol Med.**; 39:599–604, 2010.

KIS, A. et al. 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, 2009.

KREIMER, A.R. et al. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**; 14(2): 467-475, 2005.

LACO, J. et. al. The role of high-risk human papillomavirus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients: a clinicopathological and molecular study of 46 cases. **Virchows Arch**; 458:179–187, 2011.

LIMA, M.A.P. de, RABENHORST, S.H.B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 52(1): 87-96, 2006.

LÖNING, T. et. al. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. **J Invest Dermatol**; 84:417–420, 1985.

LUO, C.W.; ROAN, C.H.; LIU, C.J. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. **International journal of oral and maxillofacial surgery**; 36:153-8, 2007.

MACEDO, A.V. de; ROCHA, M.O. da C. Infecção pelo Vírus Epstein-Barr e Oncogênese. **Rev Med Minas Gerais**; 13(4):262-72, 2003.

NAIR, S.; PILLAI, M.R. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers: review article. **Oral Diseases**; 11:350-359, 2005.

SAND LP. Prevalence of Epstein-Barr vírus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod**; 93:586-92, 2002.

SZKARADKIEWICZ, A. et al. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Clin Exp Med**, 2:137–141, 2002.

WONG, M. et al. New Associations of Human Papillomavirus, Simian Virus 40, and Epstein-Barr Virus with Human Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, 94(24):1832-1836, 2002.

ZARAVINOS, A. et al. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). **Int J Biol Markers**, 24:215–222, 2009.

Anexo A – aprovação do comitê de ética em pesquisa da FOA – Unesp.

unesp

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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP–

OF. 046/2008
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 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.

Prof. Dr. Stefan Fiuza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

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

Ciente. De acordo.

0908/08

Glauco Issamu Miyahara
Dr. Glauco Issamu Miyahara