

**Comparação da prevalência do HPV-16 em
pacientes com carcinoma espinocelular de boca
e lesões potencialmente malignas bucais**

Aluna: Lígia Lavezo Ferreira

Orientador: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara

Coorientadores: Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé

Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba

2017

Lígia Lavezo Ferreira

**Comparação da prevalência do HPV-16 em
pacientes com carcinoma espinocelular de boca
e lesões potencialmente malignas bucais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – UNESP para a obtenção do
Grau de “Doutor em Odontologia” – Área de
Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara

Coorientadores: Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé

Profa. Adj. Sandra Helena Penha de
Oliveira

ARAÇATUBA - SP

2017

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- F383c Ferreira, Lígia Lavezo.
Comparação da prevalência do HPV-16 em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e lesões potencialmente malignas bucais: ausência do HPV-16 em CEC de boca e lesões potencialmente malignas bucais / Lígia Lavezo Ferreira. - Araçatuba, 2017
68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara
Coorientador: Prof. Daniel Galera Bernabé
Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira
1. Papillomavirus humano 16 2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real 3. Leucoplasia 4. Líquen plano 5. Neoplasias bucais I. T.

Black D64
CDD 617.632



DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que me capacitou e me deu forças para continuar e concluir essa jornada! Toda a minha vida e minhas conquistas são dedicadas a ti, Senhor! Sem ti não seria capaz de nada. Obrigada por tão grande amor e por nunca me desamparar nos momentos de dificuldades. Obrigada por todo o aprendizado que adquiri nos momentos de tribulações e alegrias. O Senhor é meu tudo!

À minha família: meus pais **Osi** e **Selma** e minha irmã **Taís**. Obrigada por sempre me apoiar e incentivar, por não me deixar desistir nos momentos em que fraquejei; sem vocês eu não conseguiria estar aqui! Essa conquista também é de vocês! Eu os amo e sou infinitamente grata por todo o apoio e carinho por mim!



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara**, agradeço a confiança depositada em mim, pelos inúmeros ensinamentos, pelos puxões de orelha e cobranças; que me fizeram crescer e amadurecer como pessoa e profissional! Agradeço de coração toda oportunidade concedida e por apoiar meu crescimento e jornada profissional.

À minha coorientadora, **Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelos ensinamentos, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar e por manter as portas de seu laboratório abertas para a realização desta pesquisa. Admiro-a como profissional e pessoa.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé**, por ser tão presente, compartilhando o seu conhecimento e instigando o meu espírito investigativo. Obrigada pela amizade e apoio à minha jornada acadêmica e como pesquisadora.

Ao **Prof. Dr Éder Ricardo Biasoli**, pela contribuição na minha formação clínica e científica.

À amiga **Janaína Zavitoski da Silva**, por me receber de braços e portas abertas em sua casa, sempre me tratando da melhor forma possível! Obrigada pela amizade, pelos inúmeros conselhos profissionais, pessoais e por sempre ser um ombro amigo, quando necessário. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez e faz por mim. Você, com certeza, é um dos presentes maravilhosos que a FOA me deu e que vou carregar por toda a vida!



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, na pessoa do atual Diretor, **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e do Vice-Diretor, **Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho**, instituição que me recebeu de braços abertos e que foi fundamental para me tornar o ser humano e profissional que sou hoje! Agradeço por todos os momentos vividos aqui e levo cada um em meu coração.

Ao Programa **de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do coordenador, **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

Aos **docentes da Disciplina de Patologia do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia, Profa. Ass. Dra. Cristiane Furuse, Profa. Ass. Dra. Renata Callestini Felipini e Prof. Adj. Marcelo Macedo Crivelini**, pela convivência durante o período em que passei como professora substituta das disciplinas de Patologia Bucal e Patologia Geral, juntamente com os colegas **Caril Constante Ferreira do Amaral e Marcela Rodrigues de Camargo**. Obrigada por me receberem e acolherem no departamento, paciência nos momentos de dificuldades, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade. Vocês marcaram de forma fabulosa o início da minha carreira docente.

Aos servidores do **Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Giseli Mitsuy Kayahara, Marli Barbosa dos Santos, Adriana de Paula e Silva Rahal Leal**,

Robson Varlei Ranieri e José Marcelo Tramarin, pelo carinho com que me receberam no departamento e por sempre estarem prontos a ajudar de forma prestativa e gentil.

Aos demais **docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Profa. Ass. Dra. Ana Claudia Okamoto, Prof. Ass. Dr. Antonio Augusto Ferreira de Carvalho, Prof. Titular Elerson Gaetti Jardim Júnior, Profa. Dra. Leda Maria Pescinini Salzedas**, pelos ensinamentos transmitidos e convivência no departamento.

A toda equipe e quadro de **funcionários do Centro de Oncologia Bucal**, Unidade Auxiliar de Estrutura Simples, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, **Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva, Jefferson Gardenal Teixeira, Janaína Zavitoski da Silva, Suzy Elaine Nobre de Freitas, Anne Cristina de Faria Cocato, Daniene Tesoni Cassavara Ribeiro, Regiane Mazzariolli Pereira Nogueira, Gabrielle Dias Duarte e Sabrina Macedo**, pelas conversas distraídas, amizade, palavras de incentivo e auxílio oferecido e prestados em vários momentos, o meu muito obrigada. Vocês são parte da minha família em Araçatuba. Sou extremamente grata pela amizade e pela convivência com cada um de vocês.

Aos amigos e parceiros de pesquisa **Saygo Tomo e Ingrid da Silva Santos**, muito obrigada pela amizade construída, pelo convívio e as inúmeras vezes que, prontamente, me ajudaram. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho e tornaram os momentos mais descontraídos e divertidos. São verdadeiros amigos, irmãos que recebi de presente de Deus e que vou levar sempre em meu coração!

Aos amigos da pós-graduação, **Bruna Amélia Serafim, Flávia Alves Verza, Vítor Bonetti Valente, Daniela Brito Bastos e Jéssica Araújo Figueira**, muito obrigada pela amizade verdadeira, por tornarem os momentos mais alegres, pelo aprendizado compartilhado e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho. Com vocês tudo se tornou mais fácil. Levo-os como verdadeiros amigos, minha família Araçatubense.

À minha grande amiga, **Gláucia Resende Soares**, que mesmo distante permaneceu presente; pela amizade, conselhos e incentivo nessa jornada.

À amiga **Profa. Dra. Kellen Cristine Tjioe**, obrigada pelos momentos compartilhados e conhecimentos transmitidos.

À **Profa. Adj. Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld** por realizar a análise estatística deste estudo e sempre me atender prontamente, de forma amigável e carinhosa, quando precisei.

À amiga **Dra. Cristiane Fumiko Furuse**, pela amizade, incentivo, conselhos e inúmeros ensinamentos transmitidos, que foram essenciais à minha formação científica e acadêmica.

À equipe de alunos **do Laboratório de Imuno-farmacologia**, em especial, **Victor Balera, Carluci Beltran e Aline Takamiya**, pela paciência, pela generosidade em repassar conhecimentos sobre as técnicas laboratoriais e ajuda quando me encontrava perdida nos procedimentos.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Mada e Cristiane Lui**, pela presteza com que me atenderam e por ajudar a esclarecer minhas numerosas dúvidas prontamente.

Aos alunos **graduandos em Odontologia**, obrigada pela oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

Aos **pacientes**, por aceitarem participar da pesquisa e colaborarem com a realização deste projeto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** pela bolsa de estudos concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro concedido, que viabilizou a realização desta pesquisa.

Epígrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

Ferreira LL. Comparação da prevalência do HPV-16 em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e lesões potencialmente malignas bucais [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) subtipo 16 é um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC) de orofaringe. No entanto, o papel do mesmo na carcinogênese oral, bem como a associação com as lesões potencialmente malignas, permanece controverso. O objetivo deste estudo foi comparar a prevalência do HPV-16, em amostras de tecido fresco, obtidas de 27 pacientes com CEC oral, 37 pacientes com leucoplasia bucal, 24 pacientes com líquen plano bucal (LPB) e 32 pacientes controle, correlacionando a presença do HPV com as variáveis clínico-patológicas em uma população da região noroeste do estado de São Paulo - Brasil. Realizou-se a extração do DNA das amostras e a verificação da presença do HPV-16 por meio da *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Todas as amostras foram negativas para o HPV-16 nos quatro grupos estudados. Conclui-se que a ausência do HPV-16 nas amostras de CEC bucal, leucoplasia e LPB indica que a infecção pelo mesmo não é comum e não representa um fator de risco importante na carcinogênese oral na população da região noroeste do estado de São Paulo - Brasil.

Palavras-chave: Papillomavirus Humano 16; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Leucoplasia; Líquen Plano; Neoplasias Bucais.

Ferreira LL. Comparison of the HPV-16 prevalence in patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2017.

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV), specially subtype 16, is a known risk factor for the oropharyngeal squamous cell carcinoma (SCC) development. However, HPV role in oral carcinogenesis, as well as in potentially malignant oral lesions remains controversial. The goal of the present study was to compare the HPV-16 prevalence, in fresh tissue samples obtained from 27 oral SCC patients, 34 oral leukoplakia (OL) patients, 24 oral lichen planus (OLP) patients and 32 control patients, correlating HPV presence with the clinicopathological variables in a population from northwest region of the Sao Paulo state - Brazil. DNA extraction was carried out and all samples were submitted to Real-Time PCR for HPV-16 DNA detection. We found that all fresh tissue samples of oral SCC, OL, OLP and oral normal mucosa were negative for HPV-16. We conclude that HPV-16 absence in oral SCC, OL and OLP samples indicates that its infection is uncommon and does not represent an important risk factor in oral carcinogenesis in the population from northwest region of the Sao Paulo state - Brazil.

Keywords: Human papillomavirus 16; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Leukoplakia; Lichen Planus; Mouth Neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de pacientes de acordo com a faixa etária e a idade média dos quatro grupos estudados.	63
Figura 2	Frequência de pacientes do sexo feminino e masculino nos quatro grupos estudados.	63
Figura 3	Regiões mais acometidas pelas lesões de CEC de boca (Grupo 1).	64
Figura 4	Regiões mais acometidas pelas lesões de leucoplasia bucal (Grupo 2).	64
Figura 5	Regiões mais acometidas pelas lesões líquen plano bucal (Grupo 3).	65
Figura 6	Locais da remoção dos fragmentos de tecido do Grupo Controle (Grupo 4).	65
Figura 7	Proporção do número de tabagistas em cada um dos grupos estudados.	66
Figura 8	Número de etilistas em cada um dos grupos estudados.	66
Figura 9	Resultado da <i>Real-Time</i> PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes com CEC (Grupo 1).	37
Figura 10	Resultado da <i>Real-Time</i> PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes dos Grupos	67

2 e Controle (Grupo 4).

Figura 11

Resultado da *Real-Time* PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes do Grupo 3

Lista de Tabelas

Tabela 1	Variáveis clínico-patológicas dos quatro grupos de pacientes incluídos no estudo.	36
-----------------	---	-----------

Lista de Abreviaturas

AJCC- do ingles, *American Joint Committee on Cancer*

CEC- Carcinoma Espinocelular

COB- Centro de Oncologia Bucal

DNA- do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

FOA-UNESP- Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

HPV- do inglês, *Human Papillomavirus*

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IPC- do inglês, *Internal Positive Control*

IPC Blocked- do inglês, *Internal Positive Control Blocked*

ISH- do inglês, *In Situ Hybridization*

LPB- Líquen Plano Bucal

LPMB- Lesões Potencialmente Malignas Bucais

nPCR- do inglês, *Nested Polymerase Chain Reaction*

OMS- Organização Mundial da Saúde

P16- Proteína p16

PCR- do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

Real-Time PCR- do inglês, *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RNA- do inglês, *Ribonucleic acid*

SiHa- Células de câncer cervical humano imortalizadas com o vírus HPV-16

TE- do inglês, *Tris-EDTA buffer solution*

TNM- Sistema de Classificação de tumores malignos em que T exprime o tamanho do tumor primário, N representa os linfonodos regionais acometidos e M a presença de metástase à distância.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2. PROPOSIÇÃO	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS.....	57



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA*

O câncer de boca envolve um grupo de lesões malignas que se desenvolvem nas mucosas da região dos lábios, assoalho de boca, língua, mucosa jugal, rebordo gengival, palato duro e trígono retromolar (Katsanos *et al.*, 2015), sendo o carcinoma espinocelular (CEC) o tipo de câncer de boca mais comum; correspondendo a 90% de todos os casos (Swangphon *et al.*, 2017). O CEC de boca representa o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo (Gupta and Gupta, 2015) e o quinto mais frequente em homens no Brasil (INCA, 2015).

Muitos fatores de risco estão relacionados ao desenvolvimento do tumor, especialmente o consumo crônico do álcool e do tabaco, representando cerca de 75% de todos os casos de CEC bucal (Jiang and Dong, 2017). No entanto, a incidência do CEC de cabeça e pescoço, incluindo o CEC de boca, aumentou muito nos últimos anos, principalmente em pacientes não fumantes, o que sugere que outros fatores genéticos, ambientais e imunológicos contribuem para o seu desenvolvimento (Habbous *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2013; Jiang and Dong, 2017).

O papilomavírus humano (HPV), especialmente o tipo de alto risco HPV-16, é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento do CEC de orofaringe, sendo atribuído a cerca de 40-90% dos casos (Sturgis *et al.*, 2004; Javadi *et al.*, 2017). Os tumores de orofaringe associados ao HPV têm sido considerados como um subgrupo distinto, apresentando um comportamento clínico e biológico distintos dos tumores HPV-negativos. (Guan *et al.*, 2013; Benson *et al.*, 2014; Ang *et al.*, 2010). Tumores HPV-positivos apresentam um

* Formatação de acordo com as normas do periódico Oral Diseases (**ANEXO B**)

melhor prognóstico em relação aos HPV-negativos, com taxas de sobrevida de 5 anos em 75 a 80%, contra 45 a 50% para os pacientes com tumores HPV-negativos (Ang *et al.*, 2010).

Existem mais de 130 genótipos de HPV sequenciados em humanos, entretanto a maioria dos cânceres de cabeça e pescoço está associado a um único genótipo de HPV, o HPV-16, subtipo viral também associado aos cânceres anogenitais (Marur *et al.*, 2010; Arirachakaran *et al.*, 2013). No entanto, o papel do HPV no desenvolvimento do câncer de boca continua incerto, com taxas de detecção variáveis entre 0% e 80% em todo o mundo (Gupta and Gupta, 2015; Katsanos *et al.*, 2015).

O HPV também tem sido relacionado a uma série de lesões benignas bucais, sendo que estudos recentes têm buscado uma relação entre a presença do HPV e as lesões potencialmente malignas bucais (LPMB), com taxas variáveis de detecção nessas amostras (Prakash *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

LPMB são um grupo de lesões ou condições crônicas da mucosa bucal, caracterizadas pelo potencial de transformação maligna, podendo ser precursoras do CEC de boca. Entre as LPMBs estão a leucoplasia e o líquen plano bucal (LPB) (Khan *et al.*, 2016). A leucoplasia bucal é a LPMB mais frequente. Os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento são o consumo crônico de tabaco e álcool, os mesmos relacionados ao CEC de cabeça e pescoço (Holmstrup and Dabelsteen, 2016; Bhargava *et al.*, 2016). Os resultados da detecção do HPV em leucoplasia bucais são controversos, Bhargava *et al.* (2016), utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (*Real-Time* PCR) para o HPV-16 e HPV-18 não

encontraram a presença do vírus em nenhuma das amostras de tecido de leucoplasia bucal incluídos em seu estudo. De forma semelhante, Bhosale *et al.* (2016) não encontraram nenhuma amostra de leucoplasia positiva para o HPV, usando a associação das técnicas de Nested PCR (nPCR), hibridização *in situ* (ISH) e imuno-histoquímica da p16. Avaliando uma população brasileira Ferreira *et al.* (2017) detectaram a presença do vírus em 68,75% das amostras de tecido fresco obtidos de leucoplasia bucal por meio da técnica de nPCR. Também analisando amostras de tecido Cao *et al.* (2016) observaram a presença do HPV em 2,59% dos casos de leucoplasia. Sikka and Sikka (2014) verificaram a presença do vírus em 45% dos casos de leucoplasia e Ramya *et al.* (2017), utilizando a PCR, encontraram o HPV em 20% das amostras de tecido de leucoplasia bucal.

O LPB é uma doença inflamatória crônica de origem autoimune, que pode afetar a pele e mucosas, com manifestações clínicas variáveis (Katsanos *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016). O LPB é considerado uma desordem potencialmente maligna, no entanto, há controvérsias em relação à taxa de transformação maligna do LPB, tendo sido observada em menos de 2% dos pacientes em 10 a 15 anos de acompanhamento (Katsanos *et al.*, 2015; Mattila *et al.*, 2012). A etiologia e patogênese é ainda desconhecida e uma série de hipóteses moleculares têm sido descritas, incluindo a associação com o HPV (Mattila *et al.*, 2012). A prevalência do HPV em lesões de LPB é duas vezes maior do que a encontrada em pacientes sem a lesão e a taxa de detecção do vírus varia de acordo com a região geográfica (Ma *et al.*, 2016; Sahebjamiee *et al.*, 2015). Arirachakaran *et al.* (2013) encontraram uma baixa prevalência (2,7%) do HPV em biópsias de LPB de pacientes tailandeses, enquanto

Sahebjamiee *et al.* (2015) encontraram a presença do vírus em 27,5% das amostras de LPB em uma população iraniana. Em estudos realizados em países europeus a taxa de detecção do HPV em amostras de LPB variaram entre 11,8% e 100% (Sahebjamiee *et al.*, 2015). Um estudo italiano conduzido por Montebugnoli *et al.* (2014) evidenciou 10% de amostras de LPB positivas para o HPV por meio da *Real-Time* PCR, enquanto Mattila *et al.* (2012), utilizando a nPCR, encontraram 15,9% de pacientes com LPB HPV-positivos na Finlândia. Ambos os estudos utilizaram tecido parafinado.

Essa grande variação nas taxas de detecção do HPV em LPMBs e no CEC bucal pode ser atribuída a diversos fatores, como as diferenças geográficas na população estudada, variação nos perfis dos pacientes incluídos nos estudos, tipo de material utilizado para a detecção, métodos de seleção e preparação das amostras; além dos diferentes métodos de detecção do HPV (Gupta and Gupta, 2015; Sahebjamiee *et al.*, 2015). O papel do HPV na carcinogênese do CEC de boca, bem como sua associação com as LPMB ainda é controverso e são poucos os estudos realizados na população brasileira que detectaram o HPV-16 em pacientes com CEC de boca, leucoplasia bucal e líquen plano bucal.



PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência do HPV-16, por meio da *Real-Time* PCR, em amostras de tecido fresco de pacientes com CEC de boca, LPMB (leucoplasia e líquen plano bucal) e em pacientes controle; bem como correlacionar a ocorrência do vírus com as variáveis clínico-patológicas (sexo, idade, vícios e estadiamento) dos quatro grupos estudados, em uma população da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.



MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba (FOA) - UNESP, com o número de Processo FOA-01034/2011 e CAAE: 03876012.6.0000.5420 (ANEXO A).

A população do estudo foi composta por pacientes com CEC de boca, leucoplasia bucal, líquen plano bucal e pacientes-controle sadios, diagnosticados e tratados no Centro de Oncologia Bucal (COB), Unidade Auxiliar de Estrutura Simples da FOA-UNESP e na Disciplina de Estomatologia da mesma faculdade entre os anos de 2010 e 2015. Todos os pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Crítérios de seleção

Os seguintes critérios foram adotados para a inclusão dos participantes no estudo:

Grupo 1: Pacientes com diagnóstico histopatológico de CEC de boca, matriculados no COB (FOA – UNESP);

Grupo 2: Pacientes com diagnóstico definitivo de leucoplasia bucal.

Grupo 3: Pacientes com diagnóstico definitivo de líquen plano bucal (LPB).

Grupo 4: Voluntários sem câncer, leucoplasia bucal ou LPB que aceitaram participar do estudo e que possuíam necessidade de cirurgia bucal estética, como plástica gengival ou cirurgia pré-protética.

Foram excluídas deste estudo pessoas que apresentavam qualquer tipo de infecção e febre no momento da coleta de material biológico, doença renal,

doenças autoimunes (Doença de Addison, Doença Celíaca, Dermatomiosite, Esclerose Múltipla, Miastenia Grave, Anemia Perniciosa, Artrite Reumatoide, Síndrome de Sjögren, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Esclerodermia, Vasculite, Psoríase, Doença de Behçet), que estivessem em período gestacional, que tivessem tratado alguma neoplasia maligna e que fizessem uso de imunossupressores ou quimioterápicos.

Coleta de dados e amostras

Por meio de um formulário próprio foram colhidas informações dos prontuários dos pacientes referentes ao sexo, idade, localização das lesões, grau de diferenciação das mesmas, estadiamento clínico, consumo de tabaco e bebida alcoólica.

Foram considerados tabagistas os indivíduos que fumaram regularmente durante alguma época da vida, mesmo aqueles que atualmente tinham abandonado 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.

A classificação TNM e o estadiamento clínico foram definidos de acordo com as recomendações preconizadas pelo Comitê Conjunto Americano para Estadiamento do Câncer (AJCC) para os pacientes do CEC (Grupo 1) (Lydiatt *et al.*, 2017) (**ANEXO C**). Os estádios clínicos foram divididos em: estágio clínico inicial (estádios I e II) ou estágio clínico avançado (estádios III a IVc).

O grau histológico dos CECs foi definido de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) ou pouco diferenciado (grau III). No grupo leucoplasia (grupo 2) os pacientes foram divididos de acordo com o

grau de displasia do epitélio em: ausência de displasia, displasia leve, moderada e severa.

Depois de selecionados os casos que preencheram os critérios de seleção foram realizados os procedimentos para coleta de tecido:

1. GRUPO 1: Realizaram-se biópsias das lesões com suspeita de CEC de boca e o fragmento obtido foi dividido em duas partes. Uma parte foi encaminhada para processamento histopatológico de rotina e outra foi congelada a -80°C para posterior exame de detecção do HPV. Não houve necessidade de aumentar a amplitude do procedimento cirúrgico, visto que somente 25 miligramas de material foram suficientes para a detecção do DNA. A remoção do fragmento bucal para análise molecular foi realizada de forma a não interferir na análise microscópica das margens cirúrgicas.
2. GRUPOS 2 e 3: Foram realizadas biópsias ou exéreses de lesões e os fragmentos obtidos também foram divididos em duas partes.
3. GRUPO 4 (CONTROLE): Realizou-se a coleta de tecido de forma semelhante ao descrito nos grupos anteriores. Os procedimentos cirúrgicos (cirurgia bucal estética ou cirurgia pré-protética) foram realizados independentemente da pesquisa, pois se configuraram como tratamento.

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada segundo as instruções do fabricante do kit de extração de DNA QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN Ltd, Crawley, UK).

O DNA obtido de todas as amostras foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Todas as amostras confirmaram a presença de DNA e sua boa qualidade. O DNA extraído foi armazenado em freezer - 20°C até o momento da realização do processo de detecção do HPV-16 por meio da *Real-Time* PCR.

Detecção do HPV-16 nas amostras de tecido por meio da *Real-Time* PCR

A técnica da *Real-Time* PCR foi realizada utilizando-se o kit TaqMan® de reagentes de controle exógeno interno positivo (Life Technologies®) em conjunto com os ensaios TaqMan® inventoriados para o HPV-16 (Life Technologies®) e Taqman® Master Mix Universal (Life Technologies®). Seguindo as instruções do fabricante, para cada reação foi utilizado 10µl de Taqman® Master Mix Universal, 2µl de 10x Exo IPC Mix, 0,4µl de 50x Exo IPC DNA, 1 µl de ensaios TaqMan® de detecção do HPV-16 e 4,6µl de água deionizada, compondo o mix da PCR. Em cada poço foi adicionado 18µl do mix previamente confeccionado e 2µl de 10x Exo IPC Block ou 1x Tris-EDTA (TE) ou amostra. Nos três primeiros poços, colocou-se o *Internal Positive Control Blocked* (IPC blocked), nos três seguintes foi adicionado o controle negativo (amostra de TE) e nos demais foram adicionadas as amostras de DNA. No último poço foi adicionado o DNA extraído da linhagem de células SiHa (células de câncer cervical humano imortalizada com o vírus HPV-16), como controle positivo. A reação foi realizada em tempo padrão estipulado pelo equipamento Step-One Plus (Life Technologies®).

Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha do Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA) e a análise estatística foi realizada utilizando o Software Epi Info 7 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Utilizou-se o Teste de Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, para comparação entre os grupos em relação às variáveis (sexo, idade, consumo de tabaco e álcool).



RESULTADOS

4. RESULTADOS

Um total de 27 pacientes com diagnóstico de CEC de boca, 37 pacientes com diagnóstico de leucoplasia bucal, 24 pacientes com diagnóstico de LPB e 32 pacientes-controle foram incluídos nesse estudo.

As idades médias dos pacientes que constituíram os grupos CEC (Grupo 1), leucoplasia bucal (Grupo 2), LPB (Grupo 3) e controle (Grupo 4) foram de 57,9 anos (21-88; desvio padrão de 12,64), de 58,7 anos (25-82; desvio padrão de 12,51), de 56,3 (43-72; desvio-padrão de 7,81), e de 57,5 (26-70; desvio padrão de 11,06) respectivamente. A comparação entre os grupos não mostrou diferença significativa em relação à faixa etária ($P = 0,9222$) (**Tabela 1**). Houve diferença significativa em relação ao sexo ($P < 0,0001$) (**Tabela 1**), uma vez que o grupo controle e LPB foram compostos, em sua maioria por mulheres (53,1% e 83,3%, respectivamente) em relação aos grupos CEC e leucoplasia bucal, onde a maioria dos pacientes foi do sexo masculino (85,2% e 64,9%, respectivamente) (**ANEXO D - FIGURAS 1 e 2**).

Com relação à localização das lesões, no grupo 1 a área mais acometida pelo CEC foi a região de assoalho bucal (40,7%), seguida pela língua (25,9%), rebordo alveolar (18,5%), mucosa jugal (7,4%) e região retromolar (7,4%) (**ANEXO D - FIGURA 3**). No grupo de pacientes com leucoplasia (Grupo 2) as áreas mais acometidas foram: mucosa jugal (27%), semimucosa labial (16,2%), assoalho bucal (16,2%), borda lateral de língua (13,5%), rebordo alveolar (13,5%), ventre de língua (5,4%), dorso de língua (2,7%) e palato (2,7%) (**ANEXO D - FIGURA 4**). Nos casos de LPB, que constituem o grupo 3, a área mais acometida foi a mucosa jugal (83,3%), seguida pela borda lateral de língua (12,5%) e dorso de língua (4,2%) (**ANEXO**

D - FIGURA 5). Nos pacientes do grupo controle, as áreas onde foram removidos os fragmentos de tecido normal foram: mucosa jugal (34,4%), rebordo alveolar (31,3%), língua (9,4%), mucosa labial (6,3%), retrocomissura labial (6,3%), tonsilas (6,3%) e região retromolar (3,1%) (**ANEXO D - FIGURA 6**).

Quanto aos vícios, a comparação entre os grupos mostrou diferença estatisticamente significativa para as variáveis álcool ($P < 0,0001$) e tabaco ($P < 0,0001$) (**TABELA 1**). A maioria dos pacientes que constituíram o grupo CEC e leucoplasia fumavam e bebiam em comparação com o grupo LPB e controle, onde esses vícios não se mostraram tão frequentes (**ANEXO D - FIGURAS 7 E 8**).

No grupo CEC (Grupo 1), 37% (10) dos pacientes se encontravam no estágio IV da doença, 22,2% (6) no estágio I, 22,2% (6) no estágio II, 18,5% (5) no estágio III. Os dados sociodemográficos dos pacientes dos grupos 1, 2, 3 e 4 podem ser observados na **Tabela 1**.

No grupo composto pelos pacientes com leucoplasia (Grupo 2), a maioria (75,7%) das lesões não apresentaram displasia celular, sendo observada presença da mesma em 24,3% (9) das amostras. Quanto aos tipos de lesões de LPB (Grupo 3), 45,8% eram do tipo atróficas-erosivas e 54,2% do tipo não atróficas.

Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de presença e ausência do HPV-16 através da *Real-Time* PCR. A presença do HPV-16 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas (**Tabela 1**). O *internal positive control* (IPC) funcionou em todas as reações, indicando que a reação ocorreu adequadamente (**FIGURA 9 E ANEXO D – FIGURAS 10 E 11**).

Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas dos quatro grupos de pacientes do estudo.

VARIÁVEIS CLÍNICO- PATOLÓGICAS					
VARIÁVEIS	PACIENTES GRUPO 1	PACIENTES GRUPO 2	PACIENTES GRUPO 3	PACIENTES GRUPO 4	P valor
	(n=27)	(n=37)	(n=24)	(n=32)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
PRESENÇA DO HPV-16					
HPV +	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
HPV -	27 (100)	37 (100)	24 (100)	32 (100)	
SEXO					
Masculino	23 (85,2)	24 (64,9)	4 (16,7)	15 (46,9)	<0,0001*
Feminino	4 (14,8)	13 (35,1)	20 (83,3)	17 (53,1)	
IDADE					
< 45 anos	3 (11,1)	5 (13,5)	2 (8,3)	5 (15,6)	0,9222
45-60 anos	14 (51,9)	16 (43,2)	14 (58,3)	14 (43,8)	
> 60 anos	10 (37)	16 (43,2)	8 (33,3)	13 (40,6)	
TABACO					
Tabagistas	24 (88,9)	33 (89,2)	13 (54,2)	13 (40,6)	<0,0001*
Não tabagistas	3 (11,1)	4 (10,8)	11 (45,8)	19 (59,4)	
ÁLCOOL					
Etilistas	23 (85,2)	20 (54,1)	8 (33,3)	8 (25)	<0,0001*
Abstêmicos	4 (14,8)	17 (45,9)	16 (66,7)	24 (75)	
GRAU DE DIFERENCIAÇÃO [‡]					
Ausência de displasia	-----	28 (75,7)	-----	-----	
Displasia leve	-----	7 (18,9)	-----	-----	
Displasia moderada		2 (5,4)	-----	-----	
CEC bem diferenciado (grau I)	10 (43,5)	-----	-----	-----	
CEC moderadamente diferenciado (grau II)	13 (56,5)	-----	-----	-----	
[‡] 4 pacientes do Grupo 1 não tinham informação do grau histopatológico					
ESTADIAMENTO CLÍNICO					
I	6 (22,25)	-----	-----	-----	
II	6 (22,25)	-----	-----	-----	
III	5 (18,5)	-----	-----	-----	
IV	10 (37)	-----	-----	-----	
CLASSIFICAÇÃO					
Inicial (I e II)	12 (44,4)	-----	-----	-----	
Avançado (III a IVc)	15 (55,6)	-----	-----	-----	

* Estatisticamente significante.

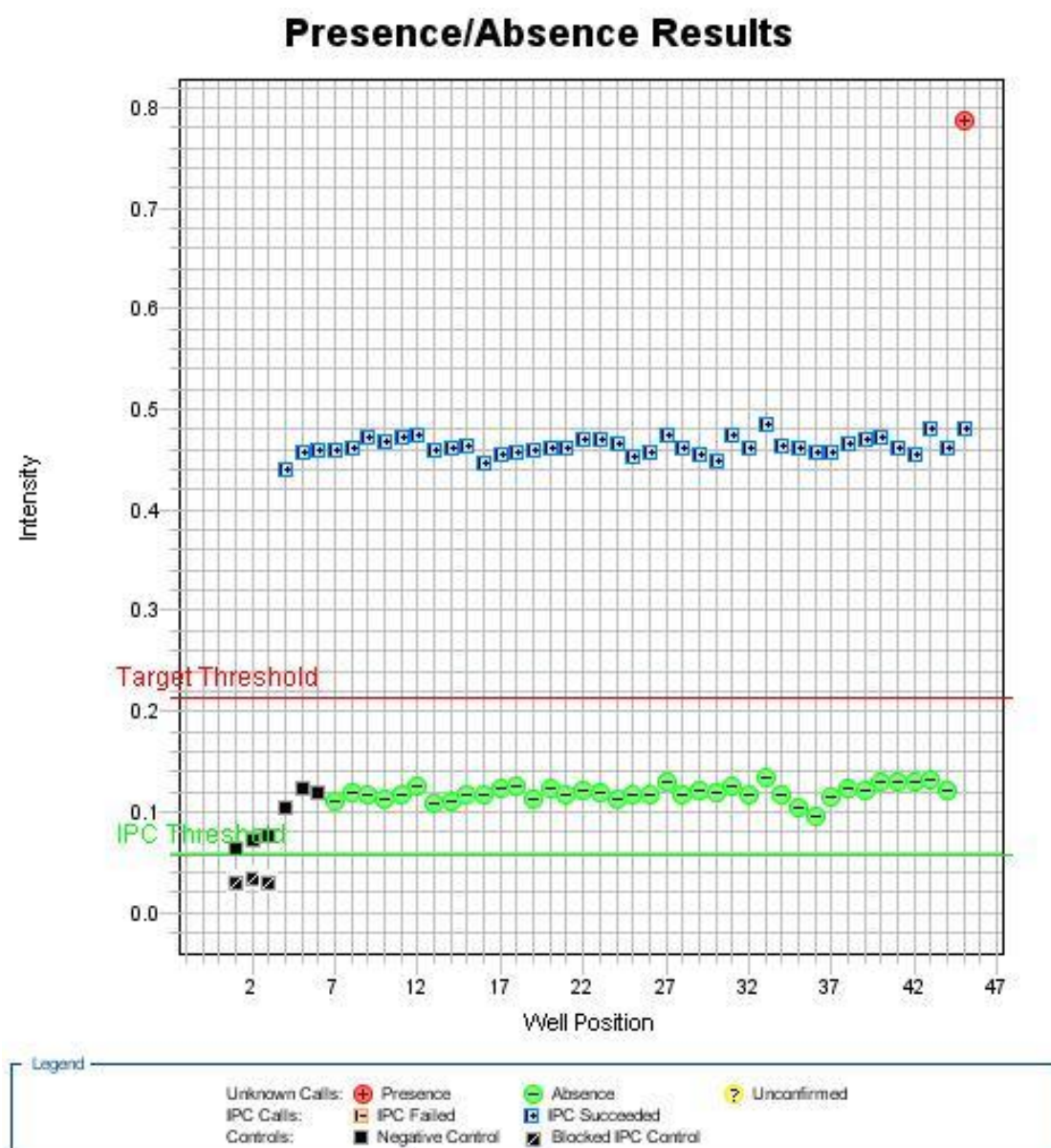


Figura 9. Resultado da *Real-Time* PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes com CEC (Grupo 1). Observa-se na última coluna uma amostra de SiHa para controle positivo.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O HPV é fator causal conhecido do câncer de colo de útero e tem sido associado a diversos tipos de tumores de cabeça e pescoço, especialmente ao CEC de orofaringe (Wang *et al.*, 2017). Em 90% dos casos, o tipo de HPV mais associado aos tumores de cabeça e pescoço é o HPV-16, no entanto a sua associação com a patogênese do CEC de boca e LPMB ainda é controversa (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

A taxas de detecção do HPV em LPMB e CEC têm variado significativamente em todo o mundo. Em uma revisão sistemática, Syrjänen *et al.* (2011) encontraram uma estreita relação entre o HPV, especialmente o HPV-16 e o CEC de boca e LPMB (leucoplasia, líquen plano bucal). Pierangeli *et al.* (2016) estudaram células exfoliadas bucais e encontraram o HPV em 75% das amostras de LPB e em 33,3% das amostras de leucoplasia bucal em uma população italiana. Na população chinesa, a prevalência do HPV tem sido mais baixa. Em um estudo conduzido por Cao *et al.* (2016), utilizando captura híbrida, o HPV foi encontrado em 12,12% das amostras de LPB, em 2,59% das leucoplasias bucais e em 7,14% dos casos de CEC bucal. Por outro lado, Chen *et al.* (2016) observaram ausência do HPV-16 e HPV-18 em todas as amostras de tecido fresco de CEC de boca e LPMB estudadas, por meio da *Real-Time* PCR, mesmo método utilizado no presente estudo para a detecção do HPV.

Um estudo conduzido por Anantharaman *et al.* (2017) mostrou uma heterogeneidade geográfica na prevalência do HPV em câncer de cabeça e pescoço. A maioria dos casos associados ao HPV-16 ocorreu nos Estados Unidos (59,3% dos casos de CEC de orofaringe e 10,6% para CEC de boca), seguido pela Europa (31,1% para CEC de orofaringe e 6,1% para CEC de

boca) e o menor número de casos associados ao HPV-16 ocorreram no Brasil (4,1% para CEC de orofaringe e nenhum de CEC de boca). Em outro estudo conduzido por Pinã *et al.* (2016), com CEC de tonsila, 75% dos casos estudados na Guatemala foram positivos para HPV-16 e HPV-18, enquanto nenhum dos casos do Brasil foram positivos para o HPV. Na Região Noroeste do Estado de São Paulo, Simonato *et al.* (2008) detectaram o HPV em 17,2% das amostras de tecido parafinado de CEC de assoalho bucal por meio da técnica de nPCR. Na mesma região geográfica, Soares *et al.* (2014) verificaram a presença do vírus em 32,4% dos pacientes com CEC de orofaringe, sendo que 16,6% foram positivas para o HPV-16 de alto risco, com a associação das técnicas de nPCR e ISH em amostras de tecido parafinado. No presente estudo, o HPV-16 foi ausente em todas as amostras de CEC de boca e LPMB, obtidas de uma população brasileira, no interior do Estado de São Paulo. Acredita-se que essa diferença nas taxas de detecção do HPV-16 pode ser explicada, em parte, pela diferença da população estudada. No presente estudo, a maioria dos pacientes são fumantes, etilistas e mais velhos, o que difere do perfil de pacientes HPV-positivos, que normalmente são pacientes jovens, com pouca exposição aos fatores de risco convencionais, sendo reconhecido como um fator de risco distinto dos CEC relacionados ao tabaco e álcool (Gupta and Gupta, 2015; Javadi *et al.*, 2017). Dessa forma, concorda-se com Anantharaman *et al.* (2017) que as diferenças na prevalência do HPV-16 entre as diferentes regiões geográficas podem ser explicadas por diferenças no consumo de tabaco e por uma idade mais elevada do grupo dos pacientes brasileiros.

Com relação aos grupos de pacientes com leucoplasia e LPB, as taxas de detecção do HPV-16 também têm variado. Bhosale *et al.* (2016) usaram associação da nPCR, ISH e imuno-histoquímica da p16 em amostras de tecido de leucoplasia e não encontraram nenhuma amostra positiva para o HPV. Por outro lado, Sikka and Sikka (2014) e Ramya *et al.* (2017), utilizando a PCR, encontraram o HPV em 45% e 20% das amostras de leucoplasia bucal, respectivamente. Saghravanian *et al.* (2015), também utilizando a PCR, não detectaram o HPV em nenhuma das amostras de leucoplasia bucal. Ferreira *et al.* (2017) avaliaram pacientes brasileiros e detectaram a presença do vírus em 68,75% das amostras de tecido fresco dos pacientes com leucoplasia em comparação com 45,8% no grupo controle, por meio da técnica de nPCR. Utilizando captura híbrida em células exfoliadas bucais, Dalla Torre *et al.* (2015) encontraram 34% das amostras positivas para o HPV de alto risco e observaram uma forte associação entre o vírus e a leucoplasia. De forma semelhante ao presente estudo, Bhargava *et al.* (2016) utilizaram a *Real-Time* PCR para o HPV-16 e 18 e não encontraram a presença do vírus em nenhum dos casos de leucoplasia bucal. No atual estudo, o HPV-16 não foi encontrado em nenhuma das amostras de leucoplasia bucal. Dessa forma, acredita-se que a conclusão de Reed & Wahlquist (2015) de que o risco de ter uma leucoplasia bucal é 3 a 4 vezes maior em pacientes com infecção por HPV bucal de alto risco, não se aplica à população da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

Em um estudo realizado por Montebugnoli *et al.* (2014), o HPV foi encontrado em apenas 10% (4/35) das amostras de LPB estudadas, sendo que apenas uma única amostra foi positiva para o HPV-16. De forma semelhante à

Mattila *et al.* (2012), que observaram a prevalência do HPV em 15,9% de lesões de LPB, no entanto apenas 8,5% (7/82) apresentavam infecção pelo genótipo de alto risco HPV-16. Sahebjamiee *et al.* (2015) encontraram a presença do vírus em 27,5% das amostras de LPB, sendo que 20% (8/40) eram positivas para HPV de alto risco 16 e 18, enquanto Arirachakaran *et al.* (2013) detectaram a presença do HPV em 2,7% dos LPB estudados. Viguier *et al.* (2015) encontraram o HPV em 50% (3/6) dos casos estudados de LPB erosivo, acreditando que exista uma ligação entre a patogênese do LPB e o HPV. Essa informação que contradiz os resultados do presente estudo, uma vez que nenhuma das amostras de LPB analisadas foi positiva para o HPV-16. Uma recente metanálise realizada por Ma *et al.* (2016) mostrou que lesões de LPB apresentam uma prevalência significativamente maior do HPV em comparação com os grupos controles. O HPV-16 foi o que mostrou associação mais forte, sendo que os autores também observaram que a correlação do HPV com o LPB variou significativamente entre as populações mundiais. Esse dado pode explicar a alta variação na prevalência do HPV no LPB, no entanto o motivo pelo qual isso ocorre é ainda desconhecido. Dessa forma, acredita-se que na população brasileira o HPV não desempenha um papel importante no desenvolvimento do LPB.

Existe uma variedade de ensaios utilizados para a detecção do HPV, entre eles o PCR convencional, *Real-Time* PCR, hibridização *in situ*, imunohistoquímica, *Western blot* e *Southern blot*, com diferentes sensibilidades (Gupta and Gupta, 2015; Chen *et al.*, 2016; Saghravanian *et al.*, 2015). No presente estudo, utilizou-se o *Real-Time* PCR para a detecção do HPV-16, o mesmo utilizado em diversos outros estudos (Syrjänen *et al.*, 2011;

Saghravanian *et al.*, 2015; Sahebjamiee *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016), por ser um método que apresenta sensibilidade de 92% e especificidade de 97% na detecção do HPV (Venuti and Paolini, 2012; Chen *et al.*, 2016). Esse ensaio, também é capaz de genotipar o HPV associado aos casos (Venuti and Paolini, 2012; Chen *et al.*, 2016). Dessa forma, acredita-se que o método de detecção não foi um fator que tenha influenciado os resultados da presente pesquisa.

Além do método utilizado, outro fator que pode interferir nos diferentes resultados entre os estudos é o tipo de material biológico e a qualidade da amostra utilizada (tecido fresco ou parafinado) (Syrjänen *et al.*, 2011; Gupta and Gupta, 2015). A melhor fonte para a detecção do HPV é o tecido fresco, mesmo material que foi utilizado no presente estudo, uma vez que o HPV é um vírus que apresenta um tropismo pelas células epiteliais escamosas e a síntese de DNA viral e a expressão de genes virais estão ligados ao nível de diferenciação de queratinócitos basais (Gupta and Gupta, 2015). Além disso, amostras parafinadas apresentam uma sensibilidade à detecção do HPV reduzida, devido à degradação do DNA e RNA causada pela impregnação com formalina. Logo, as amostras de tecido fresco congelado a melhor opção para a detecção do vírus (Venuti and Paolini, 2012; Gupta and Gupta, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Com relação às variáveis clínico-patológicas, encontrou-se diferença significativa entre os grupos com relação ao sexo e aos vícios de consumo de tabaco e álcool. Os grupos de pacientes com CEC (Grupo 1) e leucoplasia (Grupo 2) foram compostos, em sua maioria, por pacientes do sexo masculino com histórico de consumo de tabaco e álcool. Esses dados conferem com os descritos na literatura, em que os principais fatores de risco para o

desenvolvimento do CEC bucal e da leucoplasia é o consumo do tabaco em sinergismo com a bebida alcoólica; especialmente em pacientes do sexo masculino (Sikka and Sikka, 2014; Gupta and Gupta, 2015; Javadi *et al.*, 2017; Bhargava *et al.*, 2016; Shaw and Beasley, 2016).

Sabe-se que o perfil de pacientes HPV-positivo é de homens brancos jovens, com pouco ou nenhum contato com os fatores de risco convencionais (tabaco e álcool). Esse perfil está associado aos hábitos sexuais e número de parceiros ao longo da vida. Dessa forma, tumores de cabeça e pescoço HPV-positivos são considerados um subgrupo distinto daqueles relacionados ao álcool e tabaco (Gupta and Gupta, 2015; Javadi *et al.*, 2017). Os pacientes da presente pesquisa diferiram desse perfil e as lesões aqui estudadas estariam relacionadas ao consumo do tabaco e álcool e não à infecção pelo HPV-16.

A leucoplasia é uma lesão potencialmente maligna que leva ao desenvolvimento do CEC de boca, uma vez que seus fatores de risco são muito semelhantes (Bhargava *et al.*, 2016). Acredita-se, no presente estudo, que pelo fato do grupo de pacientes com leucoplasia ser formado, em sua maioria, por homens mais velhos, fumantes e etilistas, caso ocorresse transformação maligna; essa estaria relacionada ao tabaco e álcool e não à infecção pelo HPV-16. No entanto, em pacientes mais jovens, com pouco ou nenhum contato com os principais fatores de risco, o HPV pode ser um fator a ser considerado na patogênese da lesão. Outro fator importante, é que a grande maioria das lesões de leucoplasia incluídas no presente estudo não apresentava displasia, o que indica lesões com baixo potencial de malignização. Em uma revisão sistemática, Mehanna *et al.* (2009) observaram que o risco de transformação maligna da leucoplasia bucal aumenta

consideravelmente em lesões com alto grau de displasia (severo, carcinoma *in situ*). Novos estudos com uma população selecionada (formada por pacientes jovens, do sexo masculino, com pouco ou nenhum contato com álcool e tabaco) seriam necessários para ajudar a esclarecer o papel potencial do HPV nessas lesões.

Em concordância com o descrito na literatura, as lesões de LPB ocorreram predominantemente no sexo feminino entre a quarta e sexta décadas de vida (Sahebjamiee *et al.*, 2015; Munde *et al.*, 2013). O consumo de tabaco e álcool não foi tão evidente no grupo de pacientes com LPB (Grupo 3), quanto nos outros dois grupos estudados (54,2% eram fumantes e 33,3% etilistas). Provavelmente, a menor proporção de fumantes e etilistas se deve ao fato de que a maioria dos pacientes desse grupo era do sexo feminino que, geralmente, apresentam menor propensão a esses vícios. Com relação à faixa etária, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, sendo que a maioria dos pacientes que compuseram os grupos com lesões (Grupos 1, 2 e 3) e o grupo controle (Grupo 4) apresentaram mais de 45 anos. Esses dados estão em concordância com o perfil de pacientes HPV-negativos descrito na literatura (Wang *et al.*, 2017; Smitha *et al.*, 2017; Chaturvedi, 2012), que são mais velhos, fumantes crônicos e do sexo masculino.



CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo, conclui-se que o HPV-16 não foi prevalente e não representou um fator de risco importante para o desenvolvimento das LPMB e do CEC bucal na população da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, Olshan AF, Wisniewski K, D'Souza G. (2017). Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer* 140(9): 1968-1975. doi: 10.1002/ijc.30608.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Gillison ML. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363(1), 24-35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217.

Arirachakaran P, Chansaengroj J, Lurchachaiwong W, Kanjanabud P, Thongprasom K, Poovorawan Y. (2013). Oral lichen planus in thai patients has a low prevalence of human papillomavirus. *ISRN Dent* 2013: 362750. doi: 10.1155/2013/362750.

Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. (2014). The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 50(6): 565-74. 2014.

Bhargava A, Shakeel M, Srivastava AN, Raza TS, Rizvi S, Varshney P. (2016). Role of human papilloma virus in oral leukoplakia. *Indian J Cancer* 53(1): 206-9. doi: 10.4103/0019-509X.180812.

Bhosale PG, Pandey M, Desai RS, Patil A, Kane S, Prabhash K, Mahimkar MB. (2016). Low prevalence of transcriptionally active human papilloma virus in Indian patients with HNSCC and leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 122(5): 609-618.e7. doi: 10.1016/j.oooo.2016.06.006.

* Formatação de acordo com as normas do periódico Oral Diseases (**ANEXO B**)

Cao J, Jin JQ, Deng DJ, Liu HW. (2016). [Determination of human papillomavirus in oral leukoplakia, oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 48(1): 848.

Chaturvedi AK. (2012). Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol* 6(1): S16-24. doi: 10.1007/s12105-012-0377-0.

Chen XJ, Sun K, Jiang WW. (2016). Absence of high-risk HPV 16 and 18 in Chinese patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Virology* 13: 81. doi: 10.1186/s12985-016-0526-2.

Dalla Torre D, Burtscher D, Edlinger M, Sölder E, Widschwendter A, Rasse M, Puelacher W. (2015). Comparison of the prevalence of human papilloma virus infection in histopathologically confirmed premalignant oral lesions and healthy oral mucosa by brush smear detection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 119(3): 333-9. doi: 10.1016/j.oooo.2014.11.013.

Ferreira LL, Biasoli ÉR, Bernabé DG, Nunes CM, Miyahara GI. Plasma HPV DNA is detectable in oral leukoplakia patients. *Pathol Res Pract*. 2017;213(7):759-765. doi: 10.1016/j.prp.2017.04.005.

Guan X, Sturgis EM, Song X, Liu Z, El-Naggar AK, Wei Q, Li G. (2013). Pre-microRNA variants predict HPV16-positive tumors and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer Lett* 330(2): 233-40. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.048.

Gupta S, Gupta S. (2015). Role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A review of the literature. *Indian J Dent* 6(2): 91-8. doi: 10.4103/0975-962X.155877.

Habbous S, Chu KP, Qiu X, La Delfa A, Harland LT, Fadhel E, ... Liu G. (2013). The changing incidence of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using multiple imputation from 2000 to 2010 at a Comprehensive Cancer Centre. *Cancer Epidemiol* 37(6): 820-9. doi: 10.1016/j.canep.2013.09.011.

Holmstrup P, Dabelsteen E. (2016). Oral leukoplakia-to treat or not to treat. *Oral Dis* 22(6):494-7. doi: 10.1111/odi.12443.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2015). Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2014. Rio de Janeiro.

Javadi P, Sharma A, Zahnd WE, Jenkins WD. (2017). Evolving disparities in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Cancer Causes Control* 28(6): 635-645. doi: 10.1007/s10552-017-0889-8.

Jiang S, Dong Y. (2017). Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. *Curr Probl Cancer* pii: S0147-0272(16)30203-3. doi: 10.1016/j.crrproblcancer.2017.02.006.

Katsanos KH, Roda G, Brygo A, Delaporte E, Colombel JF. (2015). Oral Cancer and Oral Precancerous Lesions in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *J Crohns Colitis* 9(11): 1043-52. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv122.

Khan Z, Khan S, Christianson L, Rehman S, Ekwunife O, Samkange-Zeeb F. (2016). Smokeless Tobacco and Oral Potentially Malignant Disorders in South Asia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Nicotine Tob Res* pii: ntw310. doi: 10.1093/ntr/ntw310.

Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, Shah JP. (2017). Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67(2): 122-137. doi: 10.3322/caac.21389.

Ma J, Zhang J, Zhang Y, Lv T, Liu J. (2016). The Magnitude of the Association between Human Papillomavirus and Oral Lichen Planus: A Meta-Analysis. *PLoS One* 11(8): e0161339. doi: 10.1371/journal.pone.0161339.

Marur S, D'souza G, Westra Wh, Forastiere AA. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11(8): 781-9. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.

Mattila R, Rautava J, Syrjänen S. (2012). Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions. *Oral Oncol* 48(10): 980-4. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.04.009.

Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. (2009). Treatment and follow-up of oral dysplasia – a systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 31: 1600–9. doi: 10.1002/hed.21131.

Montebugnoli L, Gissi DB, Scapoli L, Palmieri A, Morandi L, Manelli I, Foschini MP. (2014). p16(INK4) expression is not associated with human papillomavirus in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 118(6): 694-702. doi: 10.1016/j.oooo.2014.09.004.

Munde AD, Karle RR, Wankhede PK, Shaikh SS, Kulkurni M. (2013). Demographic and clinical profile of oral lichen planus: A retrospective study. *Contemp Clin Dent* 4(2): 181-5. doi: 10.4103/0976-237X.114873

Pierangeli A, Cannella F, Scagnolari C, Gentile M, Sciandra I, Antonelli G, Polimeni A. (2016). Frequent detection of high human papillomavirus DNA

loads in oral potentially malignant disorders. *Clin Microbiol Infect* 22(1): 95.e9-95.e15. doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.011.

Piña AR, Jimenez LS, Mariano FV, de Andrade BA, Carlos R, Altemani A, de Almeida OP. (2016). Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 121(4): 412-8. doi: 10.1016/j.oooo.2015.12.002.

Prakash P, Khandare M, Kumar M, Khanna R, Singh GP, Nath G, Gulati AK. (2013). Immunohistochemical Detection of p16(INK4a) in Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res* 7(12): 2793-5. doi: 10.7860/JCDR/2013/7720.3882.

Ramya AS, Majumdar S, Babu TM, Uppala D, Srinivas B, Rao AK. (2017). Expression of Human Papillomavirus DNA and p53 Polymorphisms through Polymerase Chain Reaction in Normal Mucosa and Oral Leukoplakia Individuals with Deleterious Oral Habits. *Int J Appl Basic Med Res* 7(2):134-138. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_57_16.

Reed SG, Wahlquist AE. (2015). Adults With Oral High-risk Human Papillomavirus (HPV) and/or Smoking History Have a Higher Risk for Clinically Diagnosed Oral Premalignant Lesions. *J Evid Based Dent Pract* 15(3): 134-6. doi: 10.1016/j.jebdp.2015.07.012.

Saghravanian N, Ghazi N, Meshkat Z, Mohtasham N. (2015). Human Papillomavirus in Oral Leukoplakia, Verrucous Carcinoma, Squamous Cell Carcinoma, and Normal Mucous Membrane. *Oman Med J* 30(6): 455-60. doi: 10.5001/omj.2015.89.

Sahebjamiee M, Sand L, Karimi S, Biettolahi JM, Jabalameli F, Jalouli J. (2015). Prevalence of human papillomavirus in oral lichen planus in an Iranian cohort. *J Oral Maxillofac Pathol* 19(2): 170-4. doi: 10.4103/0973-029X.164528.

Shaw R, Beasley N. (2016). Aetiology and risk factors for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 130(S2): S9-S12.

Sikka S, Sikka P. (2014). Association of Human Papilloma Virus 16 Infection and p53 Polymorphism among Tobacco using Oral Leukoplakia Patients: A Clinicopathologic and Genotypic Study. *Int J Prev Med* 5(4): 430-8.

Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(10):593-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00704.x.

Smitha T, Mohan CV, Hemavathy S. (2017). Prevalence of human papillomavirus16 DNA and p16INK4a protein in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Maxillofac Pathol* 21(1): 76-81. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_248_16.

Soares GR, Demathé A, Mattar NJ, Biasoli ER, Miyahara GI. Absence of HPV Infection Is Associated with Smoker Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. *J Oncol*. 2014;2014:371570. doi: 10.1155/2014/371570.

Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. (2004). Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 31(6):726-33. 2004.

Swangphon P, Pientong Ch, Burassakarn A, Vatanasapt P, Kleebkao P, Patarapadungkit N, ... Ekalaksananan T. (2017). Methylation Status of

P16Ink4a in Human Papillomavirus-Associated Cancer of Oral Cavity and Oropharynx in Northeastern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 18(3): 699-705.

Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Jontell M. (2011). Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 17 Suppl 1:58-72. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x.

Venuti A, Paolini F. (2012). HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol* 6 Suppl 1:S63-74. doi: 10.1007/s12105-012-0372-5.

Viguié M, Bachelez H, Poirier B, Kagan J, Battistella M, Aubin F, ... Fazilleau N. (2015). Peripheral and local human papillomavirus 16-specific CD8+ T-cell expansions characterize erosive oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 135(2): 418-24. doi: 10.1038/jid.2014.397.

Wang F, Zhang H, Xue Y, Wen J, Zhou J, Yang X, Wei J. (2017). A systematic investigation of the association between HPV and the clinicopathological parameters and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cancer Med* 6(5): 910-917. doi: 10.1002/cam4.1045.



ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA



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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Deteção do HPV por nPCR em leucoplasias bucais: Estudo caso-controle*", sob a responsabilidade do Pesquisador GLAUCO ISSAMU MIYAHARA, está de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 27/05/2011, de acordo com o Processo FOA-01034/2011.

Araçatuba, 06 de junho de 2011¹.

ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA
Vice-Coordenadora do CEP

AMA/vdm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3234 E-mail: cep@foa.unesp.br

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba - Júlio de Mesquita Filho/ UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito das oncoproteínas virais na resposta de células T de pacientes com carcinoma espinocelular

Área Temática:

Pesquisador: Glauco Issamu Miyahara

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP

CAAE: 03876012.6.0000.5420

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 72921

Data da Relatoria: 13/08/2012

Apresentação do Projeto:

O papilomavírus humano (HPV) vem sendo associado ao carcinoma espinocelular (CEC) de orofaringe, como um possível fator etiológico. As oncoproteínas virais E6 e E7 são capazes de inibir a produção de algumas citocinas e iniciar a produção de outras, tornando a resposta celular frente à infecção deficiente. O propósito deste trabalho é avaliar a influência das oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV-16 sobre a resposta de linfócitos T (CD4+ e CD8+) de pacientes com CEC de orofaringe. Apesar do HPV ser encontrado em carcinomas de boca e estudos indicarem uma possível influência da infecção sobre o prognóstico do paciente, a exata participação desse vírus nas alterações imunológicas locais e sistêmicas não está esclarecida. Assim, na tentativa de melhor compreender como o vírus atua no sistema imune, será investigado os efeitos das oncoproteínas virais mais associadas à oncogênese (E6 e E7) sobre a resposta de linfócitos obtidos de sangue periférico de pacientes com CEC de orofaringe, acreditando que estas proteínas desregulem a resposta imune celular.

Objetivo da Pesquisa:

O propósito deste projeto é avaliar a influência das oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV-16 sobre a resposta imunológica das células T (CD4+ e CD8+) de pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O pesquisador esclarece que estes procedimentos (coleta de sangue e biópsias) serão realizados independentemente da realização desta pesquisa, pois fazem parte do processo de diagnóstico e tratamento. - Nos casos de coleta de sangue poderá haver desconforto mínimo, inerente ao procedimento, porém necessário como exame pré-operatório do paciente. Nos casos de biópsias de pacientes e cirurgias estéticas do grupo voluntário saudável os riscos são de dor pós-operatória e possível processo inflamatório, inerentes a qualquer procedimento cirúrgico com finalidade curativa ou estética. Estes procedimentos são necessários para diagnóstico (casos de carcinoma) ou tratamento oral estético (plástica gengival e frenectomia de freio lingual e labial) dos participantes.

Benefícios: Através dos resultados obtidos com este projeto, será possível hortear novas pesquisas com a finalidade de descobrir a real influência do vírus no desenvolvimento do câncer, para que medidas preventivas, como a inserção da vacina possa ser uma iniciativa de saúde pública.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa séria e de extrema importância, pois motivará novas pesquisas para se descobrir a real influência deste vírus (HPV) no desenvolvimento do câncer, para que medidas preventivas, como a inserção da vacina possa ser uma iniciativa de saúde pública.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Parece estar dentro das normas.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Analisando-se a proposta deste projeto, podemos observar que se trata uma pesquisa séria e de extrema importância, que no futuro beneficiará e muito a população como um todo, tanto com tratamentos curativos quanto com preventivos. Portanto, sou FAVORÁVEL À APROVAÇÃO deste projeto.

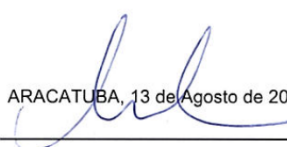
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 13 de Agosto de 2012


Assinado por:
Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune

**ANEXO B - NOME DA REVISTA E ENDEREÇO ELETRÔNICO DAS
NORMAS PARA ENVIO DOS ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.**

Oral Diseases



Impact Factor: 2.011

Online ISSN: 1601-0825

URL da página com as Normas da Revista

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1601-0825/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1601-0825/homepage/ForAuthors.html)

ANEXO C - CLASSIFICAÇÃO TNM TUMORES CAVIDADE BUCAL DE ACORDO COM A AJCC

T - TUMOR PRIMÁRIO	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤ 2 cm, ≤ 5 mm de profundidade de invasão (DOI).
T2	Tumor ≤ 2 cm com profundidade de invasão > 5 mm e ≤ 10 mm ou tumor > 2 cm, mas ≤ 4 cm e com profundidade de invasão ≤ 10 mm.
T3	Tumor > 4 cm ou qualquer tumor com profundidade de invasão > 10 mm.
T4a	Doença local moderadamente avançada: (lábio) tumor atravessa cortical óssea ou envolve o nervo alveolar inferior, assoalho bucal, ou pele da face (queixo ou nariz); (cavidade bucal) tumor invade apenas estruturas adjacentes (por exemplo, através do osso cortical da mandíbula ou maxila, ou envolve o seio maxilar ou a pele da face); Notar que a erosão superficial do osso/alvéolo (sozinho) por um tumor primário gengival não é suficiente para classificar um tumor como T4.
T4b	Doença local muito avançada; tumor invade espaço mastigador, placas pterigoideas, ou base do crânio e/ou ao redor da artéria carótida interna.
N - LINFONODOS REGIONAIS	
NX	Tumor primário não pode ser avaliado.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, 3 cm ou menos em sua maior dimensão e extensão extranodal negativa.
N2a	Metástase em um único linfonodo ipsilateral ou contralateral com 3 cm ou menos em sua maior dimensão e extensão extranodal positiva ou metástase em um único linfonodo ipsilateral maior que 3 cm mas não superior a 6 cm em sua maior dimensão e extensão extranodal negativa.
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão e extensão extranodal negativa.
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão e extensão extranodal negativa.
N3a	Metástase em um linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão e extensão extranodal negativa.
N3b	Metástase em um único linfonodo ipsilateral com mais de 3 cm em sua maior dimensão e extensão extranodal positiva; ou metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, contralaterais ou bilaterais, com qualquer extensão extranodal positiva.
M - METÁSTASE À DISTÂNCIA	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

GRUPAMENTO POR ESTÁDIOS			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estádio IVb	Qualquer T	N3	M0
Estádio IVc	T4b	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

ANEXO D – MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURAS

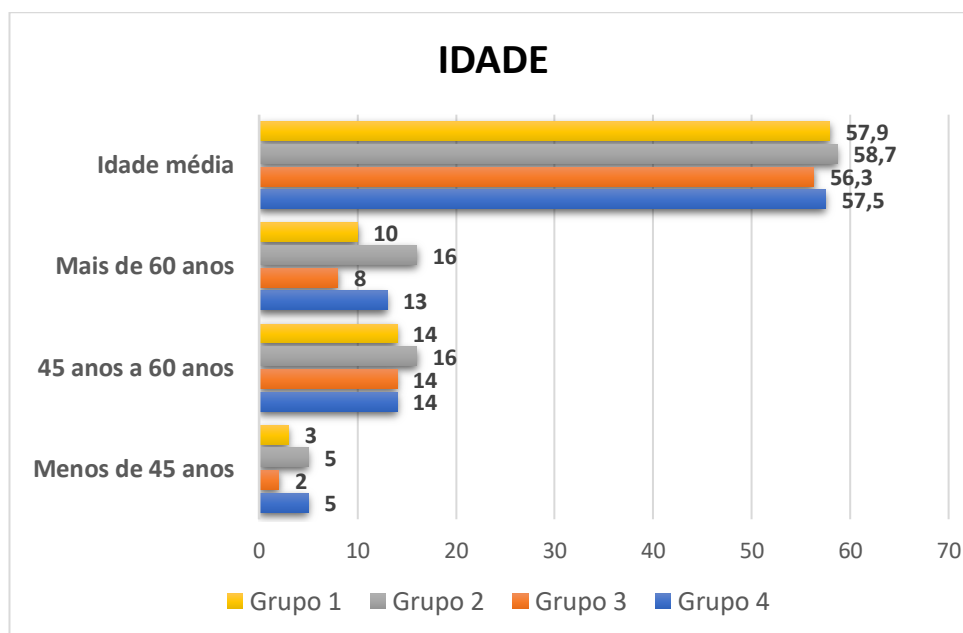


Figura 1- Número de pacientes de acordo com a faixa etária e a idade média dos quatro grupos estudados.

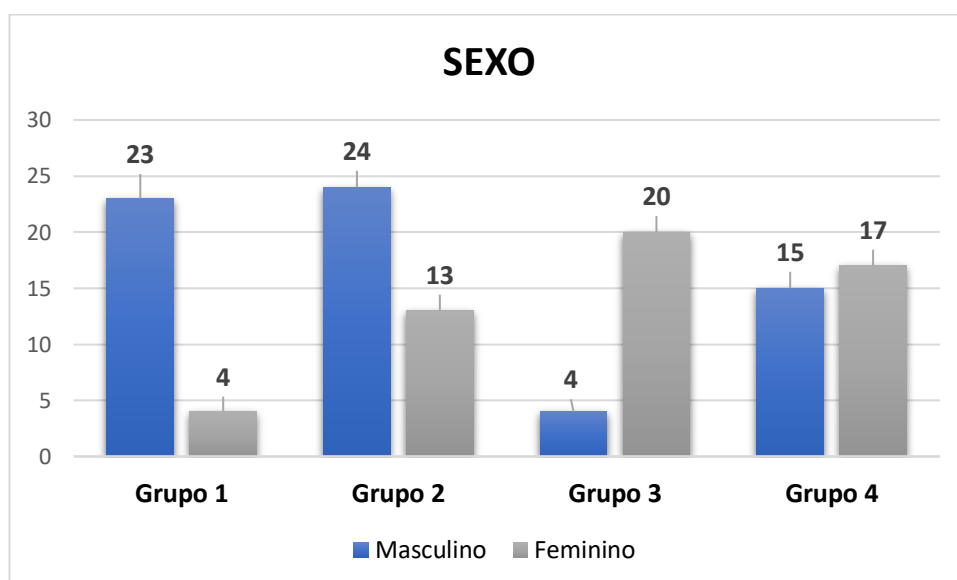


Figura 2- Frequência de pacientes do sexo feminino e masculino nos quatro grupos estudados.

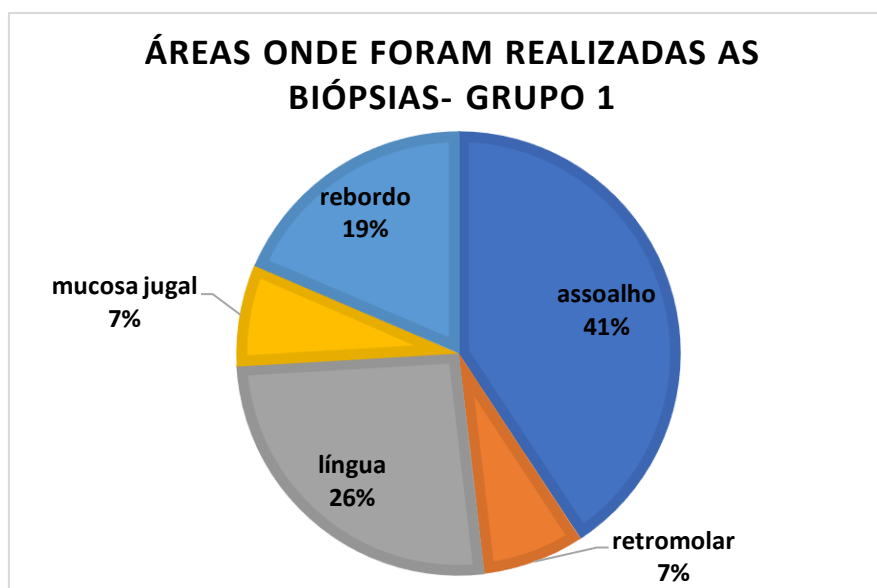


Figura 3- Regiões acometidas pelas lesões de CEC de boca (Grupo 1).

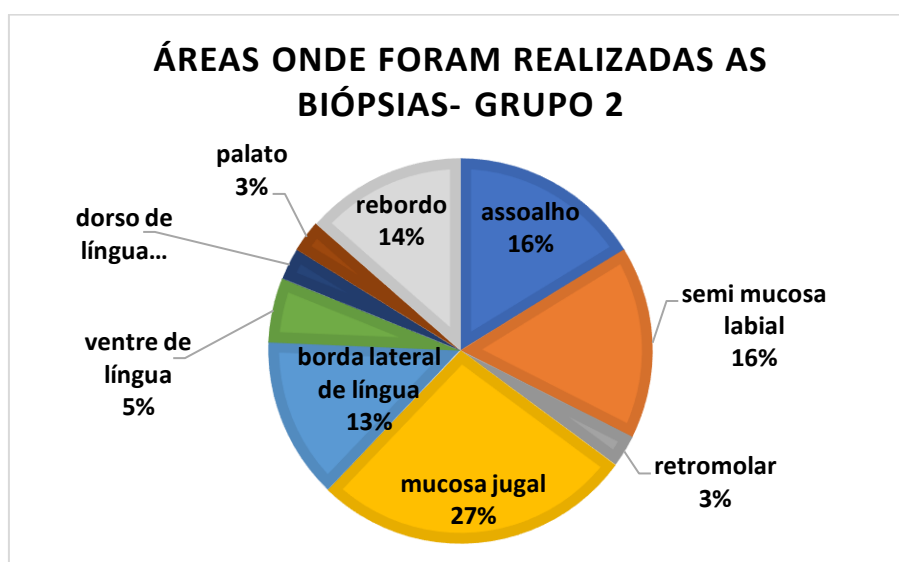


Figura 4- Regiões acometidas pelas lesões de leucoplasia bucal (Grupo 2).

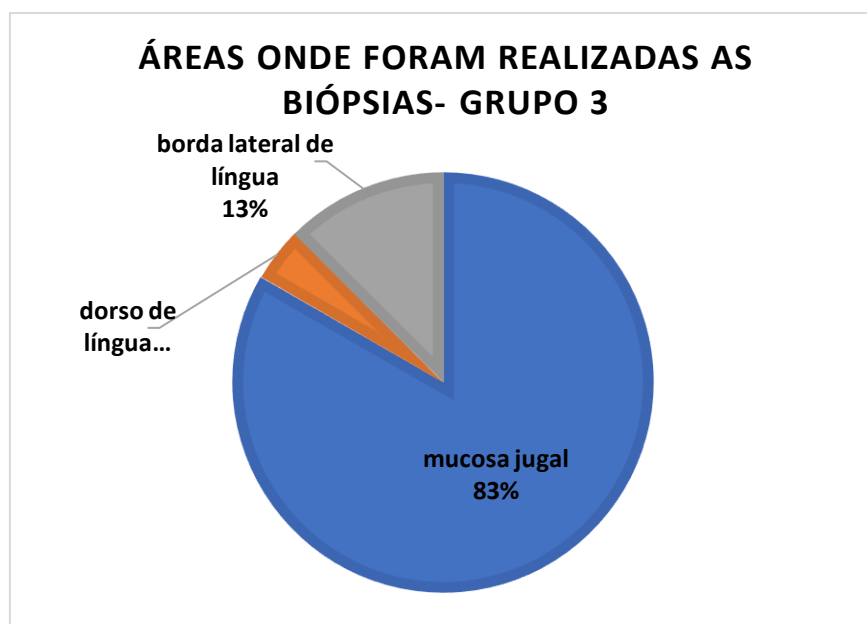


Figura 5- Regiões acometidas pelas lesões de líquen plano bucal (Grupo 3).

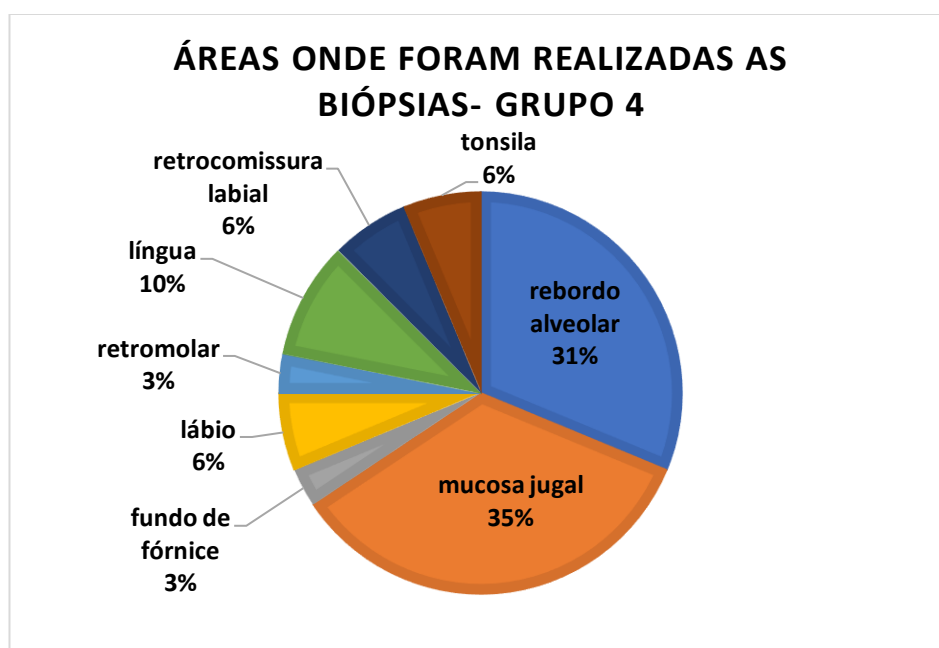


Figura 6- Locais da remoção dos fragmentos de tecido do Grupo Controle (Grupo 4).

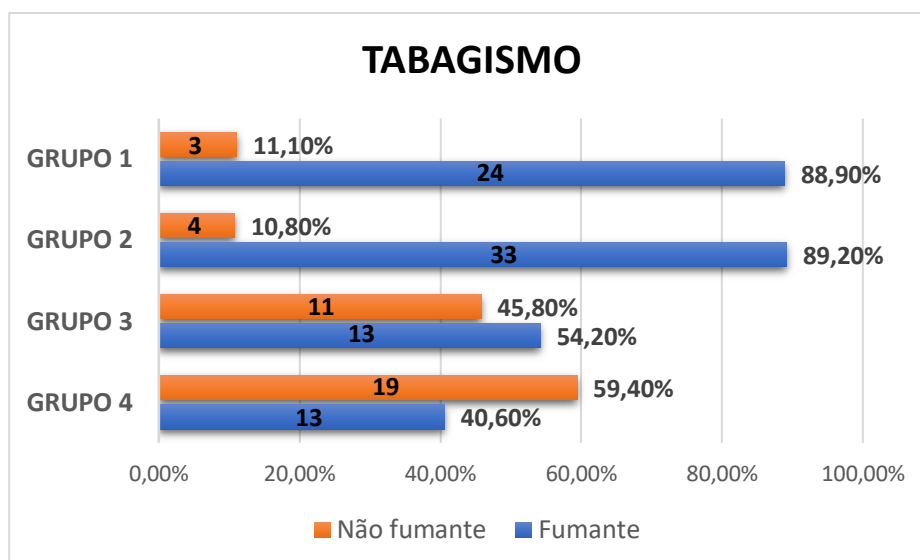


Figura 7. Proporção do número de tabagistas em cada um dos grupos estudados.

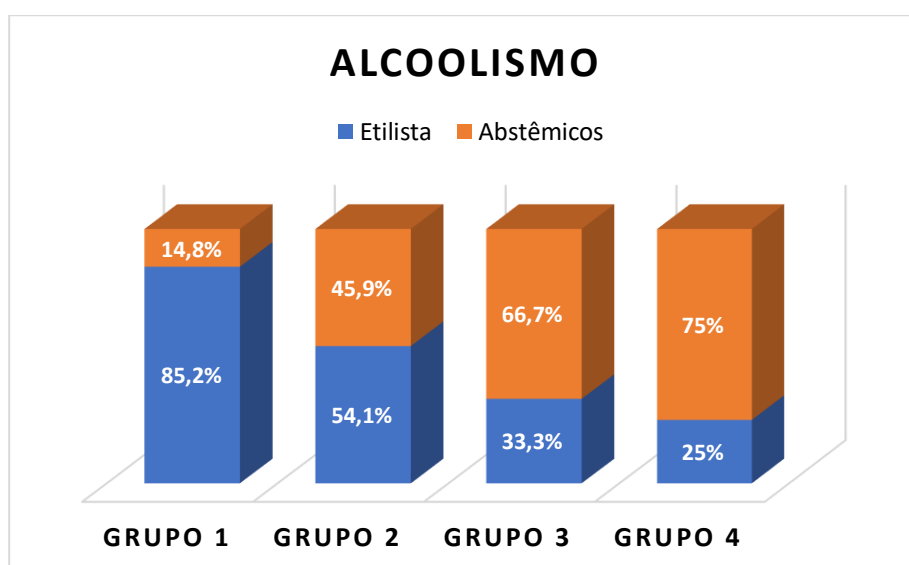


Figura 8. Número de etilistas em cada um dos grupos estudados.

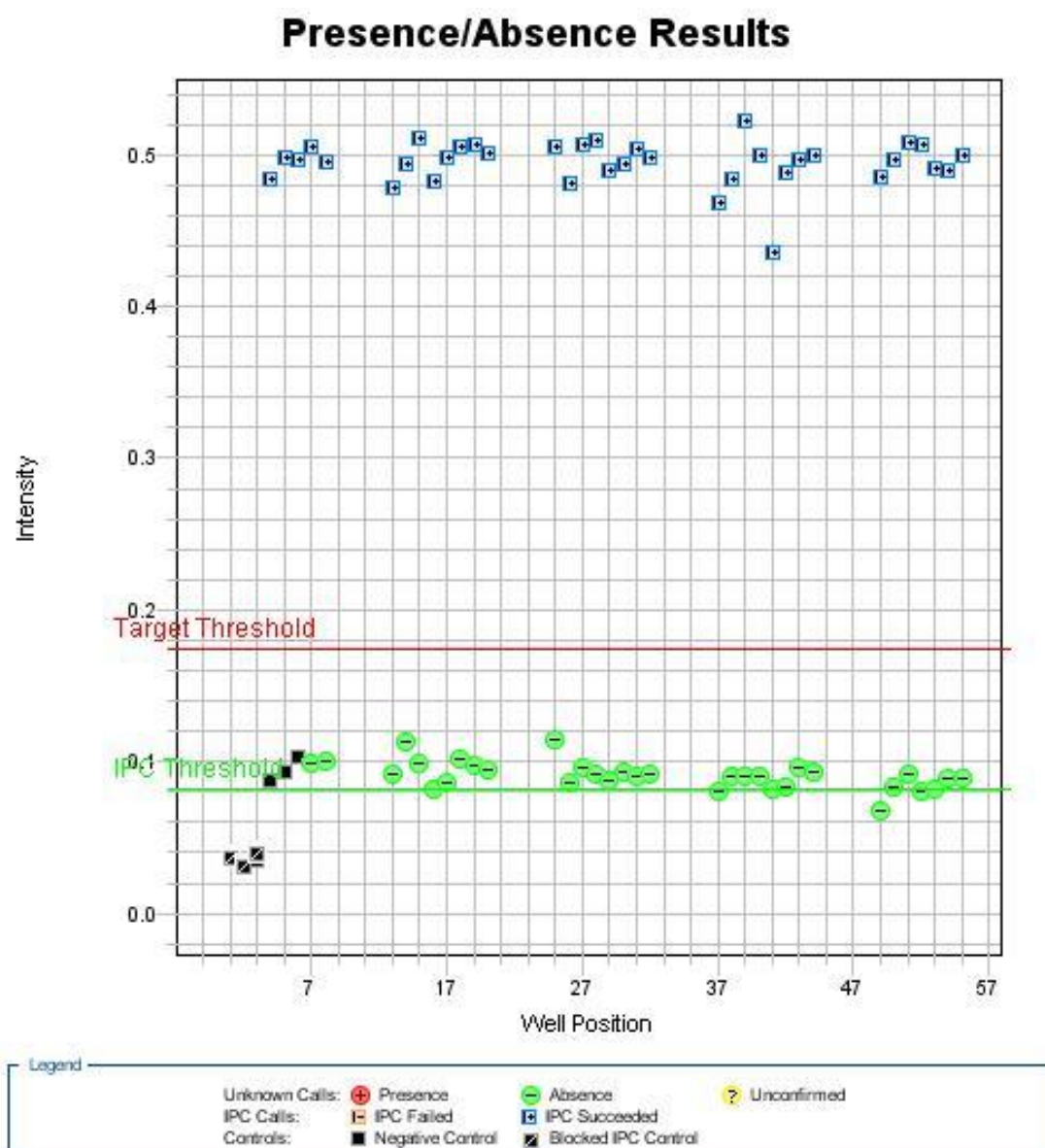


Figura 10. Resultado da *Real-Time* PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes dos Grupos 2 e Controle (Grupo 4).

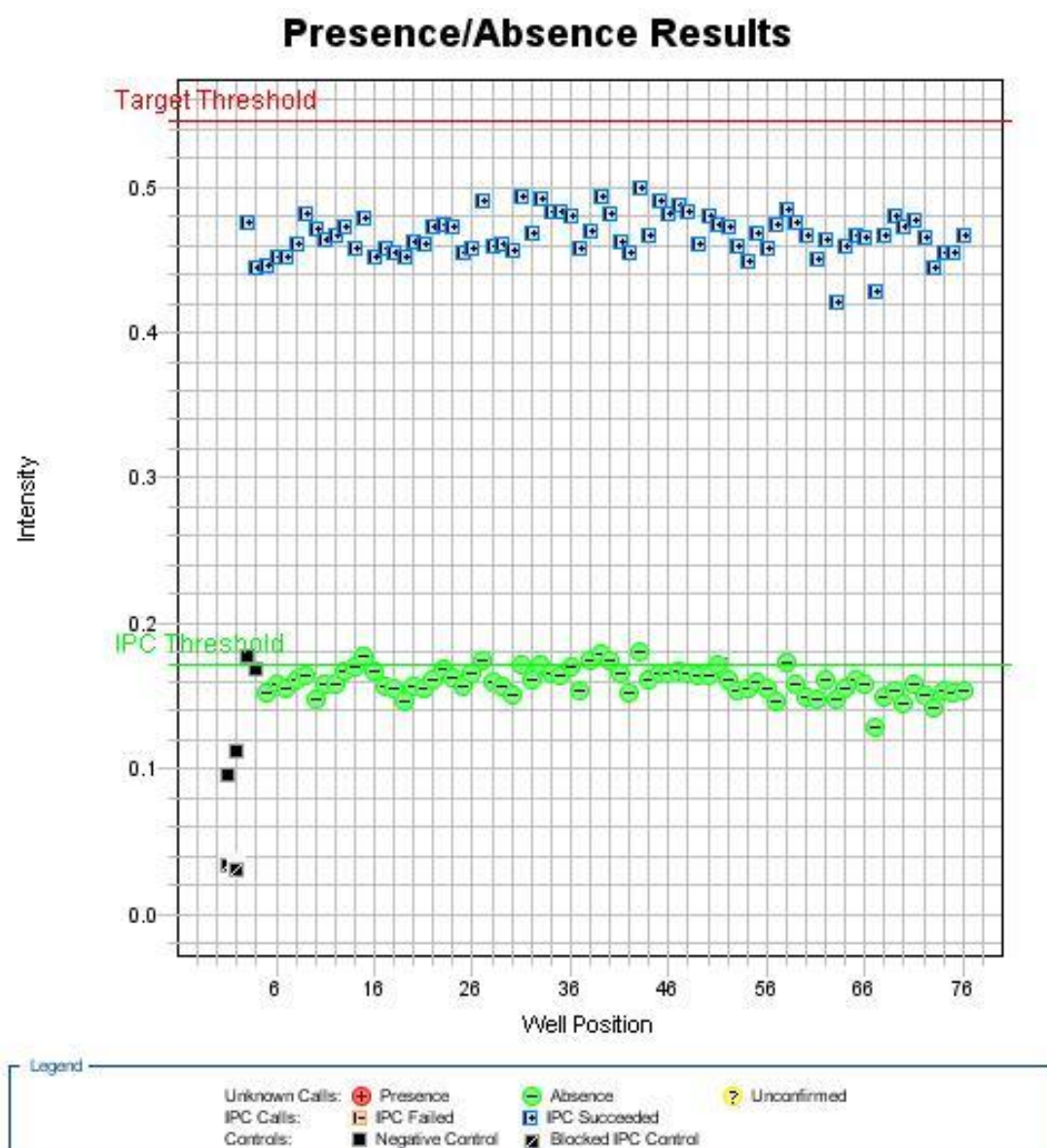


Figura 11. Resultado da *Real-Time* PCR para detecção do HPV-16 nas amostras de tecido dos pacientes do Grupo 3.