



Luciana Estevam Simonato

**Detecção do HPV por nPCR
em carcinomas epidermóides
de assoalho bucal e sua
correlação com variáveis
clínico-patológicas, fatores
de risco e sobrevida**

**ARAÇATUBA - SP
2006**

Luciana Estevam Simonato

Detecção do HPV por nPCR em carcinomas epidermóides de assoalho bucal e sua correlação com variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida

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

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

**ARAÇATUBA - SP
2006**

Dados Curriculares

NASCIMENTO.....: 22.01.1983 - Fernandópolis/SP

FILIAÇÃO: Luiz Sansão Simonato
Neusa Estevam Simonato

2001/2004: Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP

2005/2006: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Estomatologia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP

Dedicatória

A Deus, por permitir a realização de um sonho...

Aos meus pais, Luiz e Neusa, pelo amor incondicional, palavras de incentivo, apoio e extrema confiança em todos os momentos da minha vida. Minha eterna e mais profunda gratidão. Amo muito vocês!!!

Ao meu noivo, Rodrigo, pelo amor transmitido em cada palavra, gesto e olhar, pela paz que encontro ao seu lado, por sua presença carinhosa e constante e, principalmente, por existir na minha vida... Agradeço por ter você junto a mim...

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, por ter me apresentado à biologia molecular, um universo novo a ser descoberto, pela confiança depositada em mim, por sua incansável paciência durante estes anos de trabalho em conjunto e, por fim, por seu constante incentivo e perseverança, fatores que foram de fundamental importância na consecução dos resultados e nas metas obtidas. Minha eterna e mais expressiva gratidão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Fernando Garcia, por compartilhar seus conhecimentos, suscitando novos questionamentos e dando novos horizontes à pesquisa, pelas oportunidades que a mim proporcionou, sem dúvida fundamentais para o meu aprendizado e pela maneira acolhedora com que abriu as portas do seu laboratório possibilitando a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À querida e insuperável Prof.^a Dr.^a Ana Maria Pires Soubhia que, iluminada em sua forma de ser, consegue atender a tantos que recorrem a ela, muitas vezes, ao mesmo tempo, sempre com muita simpatia, solicitude e humildade. Por sua grande capacidade como pesquisadora e, ainda mais, como professora; fez a carreira acadêmica parecer cada vez mais fascinante para mim, bem como os caminhos da Patologia. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, meu eterno orientador, pelo incentivo constante, por sua impressionante capacidade de ensinar, pelos conselhos sempre sábios e, principalmente, por acreditar em mim e me fazer acreditar também... Muito obrigada de coração!!!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, no nome do atual Diretor Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e do Vice-Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Wilson Roberto Poi.

Aos docentes do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro, Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Okamoto, Prof. Dr. Antonio Augusto Ferreira de Carvalho, Prof. Dr. Éder Ricardo Biasoli, Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior, Prof. Dr. Gilberto Aparecido Coclete, Prof. Dr. Gilson Machado D'Antônio, Prof.^a Dr.^a Leda Maria Pescinini Salzedas, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini, Prof. Dr. Norberto Perri Moraes, Prof.^a Dr.^a Renata Callestini Felipini, por estenderem seus conhecimentos, pelo incentivo e pelos valiosos ensinamentos responsáveis por minha formação científica e acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Maria Aparecida Martins da Silva, Elaine Cristina Francischini Ferreira, José Marcelo Tamarin, João Batista Vieira, Katsuko Aparecida Anze Inoue, Marli Barbosa dos Santos, Mariana Bento Barbosa, Miriam Regina Mouro Ferraz Lima e Luzia Maria de Oliveira Francischini, pela eficiência em atender, sempre fazendo o melhor para corresponder às necessidades de todos e, sobretudo, pela amizade e pelo carinho que me oferecem.

Às funcionárias do Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar) da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva, Shirleni Cantieri Cavazana e Nair Ramos Macedo Cardoso, pelo atendimento sempre eficiente e cordial, pela simpatia e pelo empenho em ajudar que foram fundamentais em muitos momentos.

Ao Instituto de Patologia de Araçatuba, na pessoa do Dr. Neivio José Mattar, por cederem as amostras necessárias para o estudo e por terem atendido prontamente a cada um dos meus pedidos.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP, Érica de Souza Ribeiro, Michele Lamara Leite Bispo, Pedro Luis Florindo e Valquiria Rissato Gazola, pela

assistência, pela atenção e pelos excelentes momentos de convivência.

À Prof.^a Dr.^a Cárís Maroni Nunes, por todo o auxílio técnico e pelos momentos prazerosos de discussões sobre biologia molecular. Agradeço-a por toda assistência, que despende não só a mim, mas a todos que passam pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP.

Aos colegas Sérgio Moraes Aoki e Gustavo Arbex Avelar, por terem me auxiliado no momento inicial, compartilhando seus conhecimentos e experiências. Muito obrigada.

À Prof.^a Dr.^a Maria Lucia Marçal Mazza Sundefeld, responsável pela análise estatística desse trabalho, pela atenção dispensada a mim e a presteza com que atendeu a cada um dos meus pedidos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Diogo Luís Reatto, Marina Midori Sakamoto Kawagoe, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, pela atenção e paciência em todos os momentos.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, Alexandra Bento, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Maciel Júnior, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Fernando Fulkunishi, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez e Marina Alves dos Santos, pela atenção e carinho com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Aos colegas pós-graduandos, Adriana Demathé, Christiano Marinho Correia, Cleverson Luciano Trento, Cristiane Fumiko Furuse, Daniel Galera Bernabé, Evanice Menezes Marçal Vieira, Felipe Camargo Munhoz, Iracy Costa, João Paulo De Carli, Leandro Toyoji Kawata, Marceli Moço Silva, Paulo de Tarso Coelho Jardim, Rafael Akira Murayama, Thiago Macedo Marques, meu muito obrigada pelo convívio, pela amizade e pela troca de experiências.

Aos estagiários da Disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, em especial, à Cleide dos Anjos Santos e ao Rodrigo Yuji Takano, pela torcida e pelo companheirismo durante esses anos.

À querida Cláudia Misue Kanno, alavanca que me impulsionou a prosseguir. Obrigada por toda a atenção e prestatividade demonstrada, por ter compartilhado seus conhecimentos e experiências, por sua dedicação em ensinar e, principalmente, por sua amizade.

À amiga Melaine de Almeida Lawall, pelo constante apoio e incentivo, além da verdadeira amizade oferecida durante todos estes anos, que me encoraja nos momentos difíceis, transmitindo força para vencer os desafios e almejar novas conquistas.

À querida Denise Belúcio Ruvierre, mãe do Arthur, pela amizade incondicional, pelos ensinamentos transmitidos e, principalmente, por estar presente na minha vida. Sua dedicação à família e à profissão serão, sempre, exemplos de valor inestimável.

À minha querida amiga Ellen Greves Giovanini, por todos os momentos vividos ao seu lado, pela paciência frente às minhas ansiedades, pelo incentivo constante e pela confiança depositada em mim, fortalecendo-me nos momentos de dúvida. Você é muito especial na minha vida. Obrigada por tudo!!!

À minha querida amiga Valéria Cecília Albertoni Durão, pelo privilégio de sua convivência, por sua enorme bondade e por ter compartilhado comigo momentos de angústia e de alegria. Por ter me permitido estar tão próxima da sua família, pela cumplicidade e atenção durante todos estes anos e por ser grande exemplo de responsabilidade e, acima de tudo, de competência e profissionalismo. Sua amizade permanecerá por toda a vida. Muito obrigada!

Ao querido casal de amigos-irmãos, Alan Roger dos Santos Silva e Ana Carolina Prado Ribeiro, o meu reconhecimento e eterna dívida pelo incentivo, pelo carinho, pela enorme paciência diante das minhas ansiedades e, principalmente, por acreditarem tanto em mim. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos. Amo vocês...

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

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

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

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

Simonato LE. Detecção do HPV por nPCR em carcinomas epidermóides de assoalho bucal e sua correlação com variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2006.

Resumo

O papilomavírus humano (HPV) tem sido associado ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, seu papel na carcinogênese bucal não é bem definido. O propósito deste estudo foi investigar a prevalência do HPV em carcinoma epidermóide de assoalho bucal e correlacioná-la com variáveis clínico-patológicas e fatores de risco, bem como verificar sua influência na sobrevida dos pacientes estudados. A presença do HPV foi avaliada através da nested PCR (nPCR) (GP5+/GP6+ e MY11/MY09) em 29 amostras parafinadas de carcinoma epidermóide de assoalho bucal. O vírus foi detectado em 17.2% (5 de 29) das amostras estudadas, tendo maior prevalência em lesões de pacientes não-tabagistas com mais de 60 anos de idade. Das amostras positivas para o HPV, 100% apresentaram-se em pacientes do sexo masculino com lesões classificadas clinicamente em estágio III ou IV, geralmente com o diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado. No entanto, não houve significância estatística entre as variáveis analisadas, incluindo a sobrevida. A baixa prevalência do HPV sugere que esse vírus não participa isoladamente no desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de assoalho bucal.

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

Simonato LE. Detection of HPV by nPCR in squamous cell carcinoma of mouth floor and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2006.

Abstract

The human papillomavirus (HPV) has been associated with the development of head and neck cancers. However, its role in oral carcinogenesis is not well defined. The aim of this study was to investigate the prevalence of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and correlate its presence with clinicopathologic variables and risk factors, as well as to verify its influence in the patients' survival. The HPV presence was evaluated by nested PCR (nPCR) (GP5+/GP6+ and MY11/MY09) in 29 paraffin-embedded specimens of mouth floor squamous cell carcinoma. HPV DNA was detected in 17.2% (5 of 29) of the specimens and its higher prevalence was higher in non-smoking patients over the age of 60 years. From the HPV-DNA-positive specimens, 100% were detected in men and tumors clinically classified as stage III and IV lesions, being most of them moderately differentiated. However, no statistically significant difference was observed among the analyzed variables, including patients' survival. The low incidence of HPV DNA suggests that this virus does not participate isolatedly in the development of mouth floor squamous cell carcinoma.

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

Lista de Figuras

- Figura 1** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR das 29 amostras de carcinoma epidermóide de assoalho bucal 33
*PM = peso molecular de 100 pb; CO1 = controle positivo 1 (DNA extraído de HeLa); CO2 = controle positivo 2 (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle negativo (sem DNA)
- Figura 2** Probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma epidermóide de assoalho bucal segundo a presença ou não do HPV, pelo método de Kaplan-Meier (P = 0.2964, Log-Rank) 35
- Figura 3** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da α -globina (268 pb) das 35 amostras de carcinoma epidermóide de assoalho bucal 70
*PM = peso molecular de 100 pb; CO1 = controle positivo 1 (DNA extraído de sangue humano); CO2 = controle positivo 2 (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle (sem DNA)

Lista de Tabelas

Tabela 1	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores	29
Tabela 2	Correlação da presença do HPV com as variáveis clínico-patológicas e fatores de risco dos pacientes com carcinoma epidermóide de assoalho bucal	34
Tabela 3	Prevalência do HPV em estudos com câncer de boca	37

Lista de Abreviaturas

HPV - do inglês Human Papillomavirus

PCR - do inglês Polimerase Chain Reaction

nPCR - do inglês nested Polimerase Chain Reaction

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

DNA - do inglês Deoxyribonucleic Acid

dNTP - do inglês Deoxyribonucleotide Triphosphate

pb - pares de base

PCNA - do inglês Proliferation Cell Nuclear Antigen

Sumário

1 Introdução	21
2 Proposição	25
3 Material e Método	27
4 Resultados	33
5 Discussão	37
6 Conclusão	44
Referências	46
Anexos	53

1 Introdução*

O câncer de boca ainda hoje é um problema de saúde pública em muitas partes do mundo. No Brasil, é o quinto tumor maligno mais freqüente entre os homens e o sétimo entre as mulheres, com respectivamente, 10.060 e 3.410 novos casos estimados para o ano de 2006, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer.¹

Sua etiologia é multifatorial, sendo o tabaco e o álcool os principais fatores de risco envolvidos na carcinogênese bucal.² No entanto, também ocorre em pacientes sem história de tabagismo e etilismo.³⁻⁵ Isso indica que outros fatores, incluindo suscetibilidade genética individual, agentes externos como dieta e infecção viral, podem ter ação sinérgica na gênese do câncer de boca.⁴⁻²¹

O papel oncogênico do papilomavírus humano (HPV) no desenvolvimento do carcinoma cervical uterino está bem estabelecido.²² Entretanto, sua relação com o carcinoma epidermóide de boca ainda é pouco definida.^{9,23} A possível relação entre HPV e câncer bucal foi inicialmente sugerida por Syrjänen e colaboradores em 1983,²⁴ que descreveram, nessas lesões, alterações citopáticas tipicamente induzidas pelo HPV, idênticas às aquelas previamente encontradas no câncer uterino. Desde então, estudos foram realizados com o propósito de avaliar a presença do HPV em lesões bucais malignas.

*Normalização segundo as Normas para publicação da Revista Oral Oncology (Anexo B)

A presença do HPV foi verificada cerca de duas a três vezes mais em lesões pré-cancerosas e 4.7 vezes mais no câncer de boca do que na mucosa normal. A detecção de HPVs de alto risco (HPVs 16 e 18) em câncer bucal foi 2.8 vezes maior que os de baixo risco (HPVs 6 e 11).⁷ Desta forma, a infecção pelo HPV, particularmente aqueles com genótipo oncogênico, parece ser um importante fator de risco para o câncer de boca.

Há uma ampla variação no percentual de detecção do HPV no câncer de boca.^{7,11,23} Essa discrepância de resultados pode ser atribuída à diferença de sensibilidade dos métodos empregados,^{11,12,23,25} fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes examinados,^{6,9,26} diferentes localizações anatômicas,^{5,9,23} variações de tamanho da amostra^{6,9} e tipo de material analisado.¹¹

Diversas técnicas em biologia molecular têm sido empregadas para a detecção do HPV, tais como: captura híbrida,²⁷ hibridizações Southern blot,^{20,28,29} Northern blot, dot blot^{13,30} e in situ,²⁸ além da reação em cadeia de polimerase (PCR).^{5,9,12,14,18-20,25,28,29-32} Essas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade amplamente variáveis,^{11,12} sendo a PCR uma das mais empregadas nas diversas áreas de diagnóstico molecular, devido à sua grande capacidade de detectar pequenos fragmentos de DNA.²⁶

Como a infecção pelo HPV em boca, geralmente, tem um baixo número de cópias de DNA viral,^{15,33} um sistema de detecção altamente sensível é exigido para que se obtenham informações mais seguras sobre

a presença do vírus nas amostras de carcinoma epidermóide bucal. Uma das variações da PCR, a nested PCR (nPCR), foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a especificidade e a eficiência da amplificação do DNA alvo.³⁴ Assim, é considerada a técnica de escolha para detecção do HPV.^{4,6,10,13,15,16,27,33,35}

Além da técnica de detecção utilizada, fatores epidemiológicos relacionados aos pacientes podem ser determinantes nos resultados. Dessa forma, vários estudos clínicos e epidemiológicos têm buscado correlacionar a presença do HPV com os hábitos de fumar e beber,^{3-6,12,14-17,19,29,32} assim como com o sexo,^{5,6,12,16} a raça^{11,27,28} e a idade.^{5,10,12,14,15,20,31} A relação entre a presença do HPV e o grau histológico da lesão^{9,12,14,17-19,35} ou seu estadiamento clínico^{5,12,14,17,19,35} também foi investigada, mas com achados controversos.

Vários trabalhos estudaram a prevalência do HPV em câncer de cabeça e pescoço sem distinção entre cavidade bucal, orofaringe e laringe.^{10,15-17,28,30,31} Tal distinção é necessária já que a distribuição do vírus é diferente nos diversos sítios anatômicos, sendo em orofaringe 2,6 vezes maior que na boca.⁷ Essa variação também foi observada entre as estruturas anatômicas da própria cavidade bucal.^{4,8,9,11-13,18-20,29}

Frente as controvérsias sobre a correlação entre o HPV e o câncer de boca, parece-nos lícito estudar o assunto através de uma técnica sensível em casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal.

2 Proposição

Este trabalho teve o propósito de investigar a prevalência do HPV em carcinoma epidermóide de assoalho bucal e correlacioná-la com variáveis clínico-patológicas e fatores de risco, bem como verificar sua influência na sobrevida dos pacientes estudados.

3 Material e Método

O presente trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP (FOA-UNESP), (Processo nº 2005-00689) (Anexo A).

Foram analisadas, retrospectivamente, 35 amostras parafinadas de carcinoma epidermóide de assoalho bucal, de pacientes atendidos no Centro de Oncologia Bucal da FOA-UNESP no período de 1991 a 2005. Foram incluídos carcinomas epidermóides localizados estritamente em assoalho bucal. Os dados utilizados para avaliação das possíveis associações entre as variáveis foram obtidos dos prontuários e transcritos para uma ficha clínica individual (Anexo C).

Os cortes histopatológicos corados pela hematoxilina e eosina referentes à peça cirúrgica de cada caso foram revistos ao microscópio de luz para confirmação do diagnóstico e para escolha das amostras de tumor.

Informações sobre hábitos pessoais foram registradas. Foram considerados tabagistas os indivíduos que fumaram regularmente durante alguma época da vida, mesmo aqueles que abandonaram o vício. Os não-tabagistas foram aqueles que, em nenhum momento da vida, fizeram uso do fumo. O mesmo critério foi utilizado para classificação de etilistas e abstêmios.

O estadiamento clínico utilizado foi o proposto pela União Internacional Contra o Câncer,³⁶ que define a extensão da doença, analisando três parâmetros: extensão da neoplasia primária, grau de comprometimento de linfonodos regionais e metástase a distância. A gradação histológica da lesão foi realizada de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde.³⁷

Extração do DNA

Com o emprego de um micrótomo histológico, foram obtidos 5 cortes de 10 µm de espessura de cada bloco. 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 QIAamp DNA minikit® (QIAGEN Ltd, Crawley, UK), conforme as instruções do fabricante (Anexo D). A quantidade de DNA genômico, assim como a pureza das amostras obtidas, foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da PCR.

PCR para amplificação do gene controle

Como controle de qualidade para verificar a presença e a integridade do DNA genômico nas amostras obtidas, foi realizada a PCR

para amplificação do gene que codifica a cadeia de α -globina humana. Para tanto, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores PC04 e GH20³⁸ (Tabela 1) que amplificam um fragmento de 268 pares de base (pb). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%.

Foram empregadas como controles positivos, uma amostra de DNA extraído de sangue humano e outra de biópsia de condiloma acuminado. O controle negativo foi composto pela mistura de amplificação e substituição da amostra de DNA por água ultrapura, em mesmo volume.

Tabela 1 Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores

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

* Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

nPCR para amplificação do HPV

Após a confirmação da integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do gene do HPV através da técnica da nPCR. Para tanto, empregou-se oligonucleotídeos iniciadores genéricos MY11/MY09³⁹ e GP5+/GP6+⁴⁰ (Tabela 1), que permitem a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV já identificados.

Os oligonucleotídeos iniciadores MY11/MY09 foram utilizados na primeira etapa da nPCR para a amplificação de um segmento conservado de 450 pb da região L1 do genoma viral. A mistura de amplificação foi composta por 2.5 µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8; KCl 50 mM) (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 0.2 mM de cada dNTP (deoxyribonucleoside 5'- triphosphates - dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil), 15 pmol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Life Technologies®, Brasil), 5 µL de amostra de DNA genômico e água ultrapura (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) para totalizar o volume final de 25 µL.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) 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.

Na segunda etapa da nPCR, foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores GP5+/GP6+, que possibilitam a amplificação de um segmento de 150 pb dentro da seqüência do fragmento amplificado na primeira etapa³⁴ (Anexo F). Para tanto, utilizou-se como amostra de DNA 2 µL do produto obtido na primeira etapa. A mistura de amplificação e as condições de ciclagem foram

semelhantes à da primeira etapa da nPCR, com a única diferença de temperatura de anelamento de 43°C.

Como controle positivo para infecção por HPV, empregou-se uma amostra de DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado e outra 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 ultrapura.

Os produtos da nPCR foram 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.

Análise estatística

A tabulação dos dados, assim como toda a análise estatística deste trabalho foi realizada utilizando-se o programa EPI INFO 2000 (Center of Disease Control, Atlanta, GA, EUA).

Para a avaliação das possíveis associações entre a presença do HPV e as variáveis, sexo, raça, idade, estadiamento clínico da lesão, gradação histológica, consumo de tabaco e ingestão de álcool, foi aplicado o teste X^2 ou teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. A comparação das curvas de probabilidade acumulada de sobrevida com a presença ou ausência do HPV pelo método de Kaplan-Meier foi realizada com a aplicação do teste Log-Rank, com nível de significância de 5%.

4 Resultados

Trinta e cinco casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal foram obtidos, sendo que 6 foram excluídos do estudo, uma vez que não apresentaram amplificação da α -globina (Anexo G). Dessa forma, a análise da presença do HPV foi efetuada em 29 amostras. Dentro da presente metodologia, detectou-se o HPV em 17.2% (5 de 29) das amostras, como pode ser observado na Figura 1.

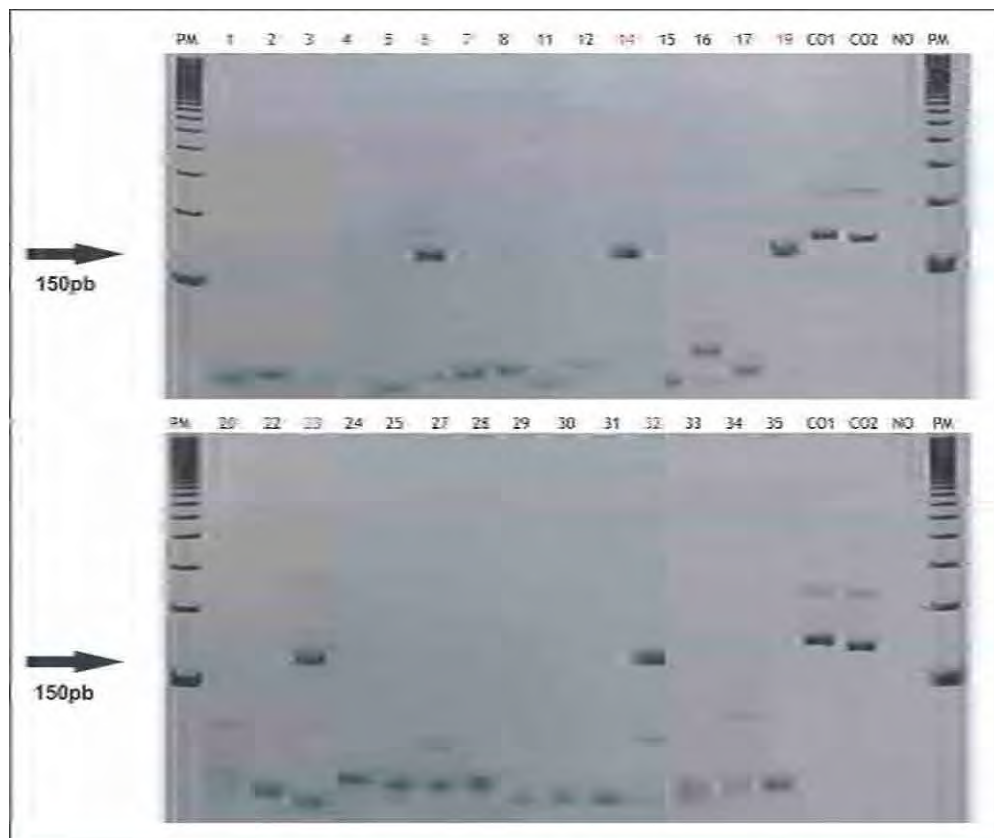


Figura 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando resultado da amplificação do HPV (150 pb) por nPCR das 29 amostras de carcinoma epidermóide de assoalho bucal

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

A correlação entre a presença do HPV e as variáveis estudadas (sexo, raça, idade, estadiamento clínico, gradação histológica, tabaco e álcool) é mostrada na Tabela 2. Não foi observada nenhuma significância estatística entre essas variáveis. A associação mais próxima de ser estatisticamente significativa foi entre a presença do HPV e os pacientes não-tabagistas ($P = 0.0684$). Todos os tumores HPV-positivos ocorreram em pacientes do sexo masculino e apresentavam-se com estadiamentos clínicos III e IV.

Tabela 2 Correlação da presença do HPV com as variáveis clínico-patológicas e fatores de risco dos pacientes com carcinoma epidermóide de assoalho bucal

Variáveis	□ pacientes (%) (n=29)	HPV + (%) (n = 5)	HPV - (%) (n = 24)	P*
Sexo				0.6798
Masculino	27 (93.1)	5 (100)	22 (91.7)	
Feminino	2 (6.9)	0	2 (8.3)	
Raça				0.4977
Branca	20 (69)	4(80)	16 (66.7)	
Não-branca	9 (31)	1 (20)	8 (33.3)	
Idade				0.2693
< 60	23 (79.3)	3 (60)	20 (83.3)	
≥ 60	6 (20.7)	2 (40)	4 (16.7)	
Estadiamento clínico				0.2218
I/II	7 (24.1)	0	7 (29.1)	
III/IV	22 (75.9)	5 (100)	17 (70.8)	
Gradação histológica				0.3528
Bem diferenciado	7 (24.1)	1 (20)	6 (25)	
Moderadamente	21 (72.4)	4 (80)	17 (70.8)	
Pobremente	1 (3.5)	0	1 (4.2)	
Tabaco				0.0684
Tabagista	26 (89.7)	3 (60)	23 (95.8)	
Não-tabagista	3 (10.3)	2 (40)	1 (4.2)	
Álcool				0.2665
Etilista	18 (62.1)	2 (40)	16 (66.7)	
Abstêmio	11 (37.9)	3 (60)	8 (33.3)	

* teste X^2 ou teste exato de Fisher.

O teste Log-Rank, que compara as curvas de probabilidade acumulada de sobrevida com a presença ou ausência do HPV (Figura 2), também não apresentou significância estatística ($P = 0.2964$).

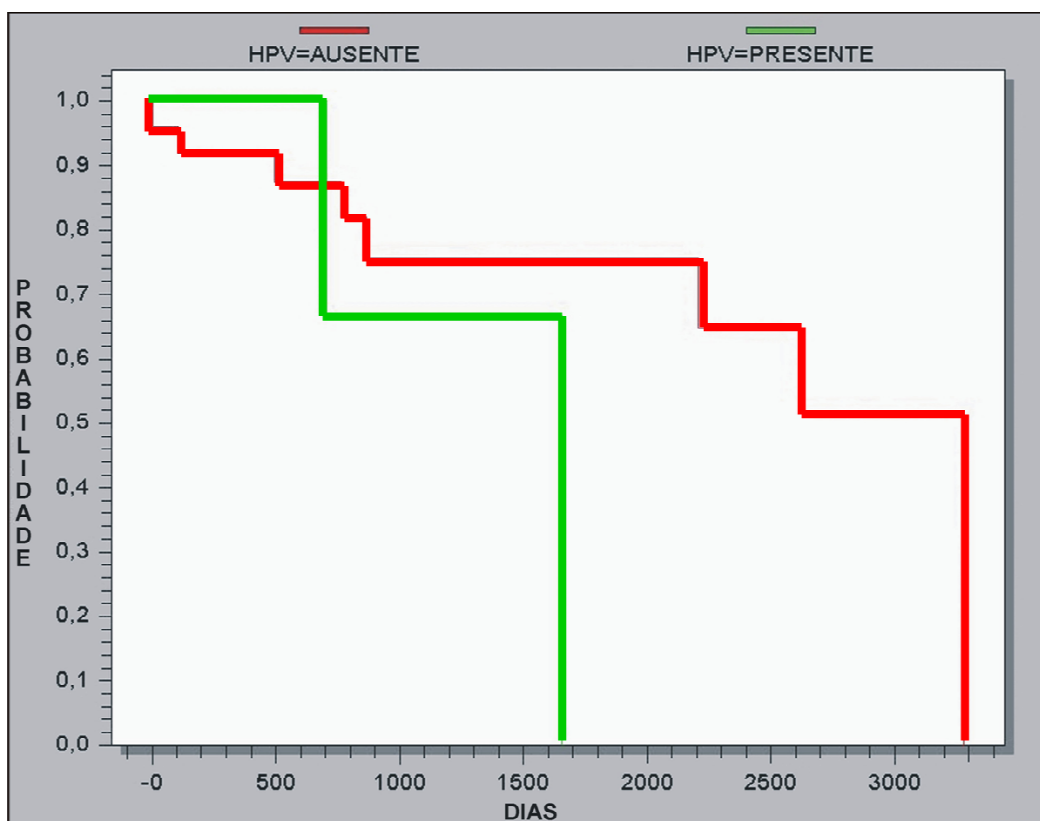


Figura 2 Probabilidade de sobrevida acumulada dos pacientes com carcinoma epidermóide de assoalho bucal segundo a presença ou não do HPV, pelo método de Kaplan-Meier ($P = 0.2964$, Log-Rank)

5 Discussão

Estudos sobre a correlação entre HPV e o câncer de boca mostraram uma variação de 0 a 100% de casos infectados pelo vírus, como pode ser observado na Tabela 3. Resultados discrepantes podem ser explicados pelas diferentes metodologias utilizadas,^{11,12,23,25} características epidemiológicas distintas dos pacientes estudados^{6,9,25,26} e dificuldade em se realizar estudos individualizados de acordo com os diversos sítios anatômicos na região de cabeça e pescoço.^{5,9,23}

Tabela 3 Prevalência do HPV em estudos com câncer de boca

Estudo	Método de detecção	Tipo de material	HPV +	%
Cruz et al, 1996 ²⁰	PCR	tecido fresco	19/35	54.3
Bouda et al, 2001 ¹³	nPCR	tecido parafinado	18/19	94.7
Gillison et al, 2000 ²⁸	PCR	tecido fresco	10/84	12
Sisk et al, 2000 ³¹	PCR	tecido fresco	11/22	50
Uobe et al, 2001 ⁸	In situ PCR	tecido parafinado	20/20	100
Nagpal et al, 2002 ²⁹	PCR	tecido fresco e tecido parafinado	37/110	33.6
Ringström et al, 2002 ¹⁴	PCR	tecido fresco	2/41	4.9
Chang et al, 2003 ⁴	hemi-nPCR	tecido parafinado	51/103	49.5
Ritchie et al, 2003 ¹⁶	hemi-nPCR	tecido parafinado	10/94	10.6
Sugiyama et al, 2003 ¹⁸	PCR	tecido parafinado	30/86	34.9
Báez et al, 2004 ¹⁷	PCR	tecido fresco	13/36	25
Correnti et al, 2004 ⁹	PCR	tecido parafinado	8/16	50
Cortezzi et al, 2004 ³⁰	PCR	tecido fresco	1/8	12.5
Smith et al, 2004 ¹⁰	hemi-nPCR	tecido parafinado	13/126	10.3
Smith et al, 2004 ¹⁵	hemi-nPCR	células exfoliadas	19/130	15
Zhang et al, 2004 ¹²	PCR	tecido parafinado	54/73	74
Ibieta et al, 2005 ⁶	nPCR	tecido fresco	21/50	42
Tachezy et al, 2005 ⁵	PCR	tecido parafinado	3/12	25
Campisi et al, 2006 ³⁵	nPCR	células exfoliadas	24/63	38.1
Nemes et al, 2006 ¹⁹	PCR	tecido parafinado	33/79	42
Rivero e Nunes, 2006 ²⁵	PCR	tecido fresco e tecido parafinado	0/40	0
Simonato, 2006	nPCR	tecido parafinado	5/29	17.2

Essa discrepância entre os resultados é creditada, principalmente, ao tipo de material analisado e ao método de detecção utilizado. Miller e White¹¹ verificaram a presença do HPV mais freqüentemente em tecido fresco (51.6%) do que naquele incluído em parafina (21.7%), sendo esse achado explicado pelo fato de os processos de formolização, parafinização e desparafinização serem capazes de degradar o DNA, dificultando a detecção viral. No entanto, trabalhos nos quais foram utilizados tecidos incluídos em parafina obtiveram altas taxas de amplificação do DNA viral quando utilizaram métodos de detecção mais sensíveis, como a nPCR.^{4,13} A nPCR é uma técnica considerada altamente sensível para a detecção do HPV, uma vez que detecta o vírus mesmo quando existe um número pequeno de cópias de DNA viral, sendo bastante eficaz em estudos com tecido parafinado.⁴¹ A maior efetividade da técnica foi comprovada no presente trabalho, em que o material genômico do HPV foi detectado apenas na segunda fase de PCR.

A prevalência do HPV em carcinomas epidermóides de boca também é variável de acordo com os sítios anatômicos específicos de acometimento da lesão. Miller e White¹¹ mostraram uma maior taxa de detecção do vírus em lesões de língua (29.1%), seguida pelas de assoalho bucal (19.7%). Entretanto, Nemes et al.¹⁹ e Cruz et al.²⁰ relataram, respectivamente, 60.6% e 85.7% de tumores HPV-positivos em assoalho bucal. A fim de se obter resultados mais fidedignos com relação à prevalência do HPV no câncer de boca, optou-se nesse trabalho pela padronização da área anatômica acometida pela lesão, o sítio de escolha

foi o assoalho bucal. Essa área foi estudada, uma vez que, epidemiologicamente, é uma das localizações de maior prevalência do carcinoma epidermóide na cavidade bucal.⁹

O HPV foi encontrado em 17.2% dos tumores. Esses índices são ligeiramente mais altos que os obtidos por Smith et al.¹⁰ e Ritchie et al.¹⁶, que a partir de amostras de carcinoma epidermóide de boca incluídas em parafina, descreveram resultados em torno de 10% utilizando nPCR. O uso de tecido fresco parece melhorar a sensibilidade do método, já que Ibieta et al.⁶ obtiveram 42% de positividade para o HPV nesse tipo de amostra. A necessidade de utilizar tecido incluído em parafina como fonte de DNA, devido a possibilidade de realizar um estudo retrospectivo de 15 anos, foi compensada pela escolha de um método de detecção mais sensível, a nPCR. No entanto, é bem provável que a utilização dessa metodologia em tecido fresco possa aumentar os índices de detecção do vírus.

Todos os pacientes positivos para o HPV eram do sexo masculino. No entanto, não houve diferença estatística entre o grupo feminino e o masculino, pois o número de mulheres que compunham a população era pequeno. Esse dado está de acordo com os obtidos em trabalhos, que verificaram a ausência de relação entre o HPV e o sexo.^{5,19,29,30} Porém, alguns estudos relataram uma prevalência mais alta do HPV no sexo feminino,^{4,9} enquanto outros no sexo masculino.^{6,12,14,16,20}

Quanto a idade, 33.3% das amostras obtidas de pacientes com idades acima dos 60 anos foram positivas para o HPV. No entanto, dos 29

pacientes analisados, apenas 6 (20.7%) apresentavam-se nessa faixa etária, enquanto que os demais se encontravam dentro da faixa etária de 41 a 59 anos. Essa grande diferença entre os grupos resultou na ausência de significância estatística na relação entre o HPV e a idade. O mesmo foi observado por Sisk et al.³¹ que verificaram a presença do HPV no câncer bucal em todas as faixas etárias. Com relação à raça, nossas análises estatísticas também não mostraram correlação significativa, à semelhança dos resultados obtidos por alguns dos estudos.^{10,15,16,28,32}

No presente estudo, 89.7% dos pacientes eram tabagistas. Dentre esses, 11.5% eram HPV-positivos, enquanto que no grupo dos não-tabagistas o vírus foi detectado em 66.7% dos pacientes. Alguns estudos demonstraram que a infecção pelo HPV parece ser independente da exposição ao álcool e ao tabaco.^{3,7,15,19,21,28} No entanto, apesar de não termos observado significância estatística na correlação entre o HPV e o tabaco, é importante notar a predominância do HPV em pacientes não-tabagistas. Esse achado pode sugerir que a presença do HPV seja, de alguma forma, limitada pelo tabaco. Sabe-se que o fumo, normalmente, induz uma maior queratinização do epitélio, o que, por sua vez, torna as mucosas da cavidade bucal e orofaringe mais resistentes a traumas secundários, proporcionando um efeito protetor à infecção pelo HPV.¹⁶ Por outro lado, há indícios de que o HPV seja um fator importante no desenvolvimento de câncer de boca em pacientes não-tabagistas.^{4,20,32}

Embora não tenha havido significância estatística, o HPV foi encontrado somente em tumores com estadiamentos clínicos III e IV.

Sabe-se que os tumores HPV-positivos apresentam maior atividade proliferativa do que tumores livres do vírus, como observado em estudos utilizando marcadores de proliferação como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que é expresso em até 94.7% dos carcinomas epidermóides de boca infectados pelo HPV.⁴² Apesar disso, o HPV parece não agravar o grau de diferenciação histológica da lesão, pois o vírus não foi detectado em nenhum caso pobremente diferenciado.

A maior prevalência do HPV em tumores bem e moderadamente diferenciados pode ser explicada pelo fato deste estar relacionado à fase inicial da carcinogênese bucal.^{13,17,18} Além disso, o ciclo de vida viral parece ser melhor suportado por lesões bem diferenciadas.²⁰ No entanto, permanece incerto se esta é uma relação causal, pois a infecção pelo HPV também é ativada pela doença.²¹ Para responder esta pergunta, estudos adicionais são necessários, incluindo a investigação dos exatos papéis das proteínas E5, E6 e E7 produzidas pelo HPV.

Esses achados parecem justificar os dados previamente publicados em relação à sobrevida do paciente. Acredita-se que pacientes cujos tumores estejam infectados pelo HPV tenham 59% de redução no risco de morte por câncer quando comparado com o grupo HPV-negativo.²⁸ De fato, diversos estudos têm mostrado uma taxa de sobrevida mais alta de pacientes com tumores positivos para o HPV.^{14,16,28,31} No presente estudo, a presença do HPV não teve qualquer correlação significativa com a sobrevida. A presença do HPV exclusivamente em tumores com estadiamentos clínicos mais avançados, sem que houvesse alteração da

sobrevida dos pacientes estudados, parece confirmar a hipótese de que os carcinomas de cabeça e pescoço infectados pelo HPV compreendem entidades patológicas distintas aos níveis molecular e clínico, o que se refletiria no aumento da sobrevida.^{5,10,14,17,28} Dessa forma, a identificação do HPV torna-se de grande importância clínica, já que essa observação poderia ter um forte impacto na futura abordagem clínica desses pacientes, merecendo investigações adicionais.

6 Conclusão

Os resultados obtidos através da presente metodologia permitiram concluir que:

- apesar da ausência de significância estatística, há uma maior prevalência do HPV em pacientes não-tabagistas, com mais de 60 anos de idade e com lesões em estágios clínicos III e IV;
- sua presença ou ausência não tem correlação estatisticamente significativa com o sexo, a raça e a sobrevivência dos pacientes acometidos pelo carcinoma epidermóide de assoalho bucal;
- a baixa prevalência do HPV sugere que esse vírus não participa isoladamente no desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de assoalho bucal estudados.

Referências*

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
- 2 Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108(5):741-9.
- 3 Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2620-6.
- 4 Chang JY, Lin MC, Chiang CP. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Am J Clin Pathol* 2003;120(6):909-16.
- 5 Tachezy R, Klozar J, Saláková M, Smith E, Turek L, Betka J, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11(3):181-5.
- 6 Ibieta BR, Lizano M, Frías-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ruíz-Godoy LM, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(3):311-5.
- 7 Miller CS, Johnstone B. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(6):622-35.
- 8 Uobe K, Masuno K, Fang YR, Li LJ, Wen YM, Ueda Y, et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol* 2001;37(2):146-52.

*Normalização segundo as Normas para publicação da Revista Oral Oncology (Anexo B)

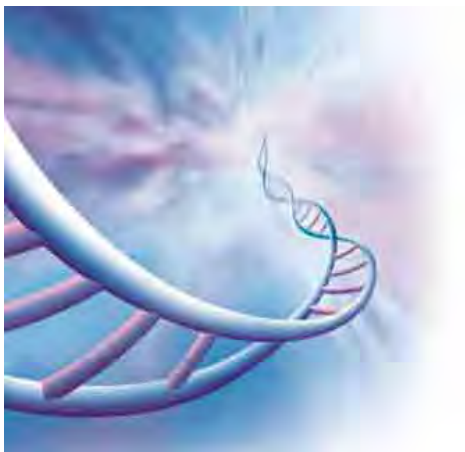
- 9 Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 2004;10(3):163-6.
- 10 Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108(5):766-72.
- 11 Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(1):57-68.
- 12 Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(1):71-4.
- 13 Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoi E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000;13(6):644-53.
- 14 Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187-92.
- 15 Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffamn HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Institute* 2004;96(6):449-55.
- 16 Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104(3): 336-44.
- 17 Báez A, Almodóvar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S,

- et al. High frequency of HPV 16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck* 2004;26(9):778-84.
- 18 Sugiyama M, Bhamal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(5):594-600.
 - 19 Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of p16^{INK4A}, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(3):344-52.
 - 20 Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(1):55-62.
 - 21 Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 2002;38(3):227-34.
 - 22 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-9.
 - 23 Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(4):188-96.
 - 24 Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pürhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12(6):418-24.
 - 25 Rivero ERC, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res*

- 2006;20(1):21-4.
- 26 Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2005;34(1):62-4.
 - 27 Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Aricò P, Ammatuna P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3861-4.
 - 28 Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-20.
 - 29 Nagpal JK, Patnaik S, Das BR. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with p53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern Indian. *Int J Cancer* 2002;97(5):649-53.
 - 30 Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PMP, Freitas SEN, et al. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150(1):44-9.
 - 31 Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G, et al. Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2000;22(7):649-57.
 - 32 Miyahara GI, Rahal P, Biazolla ER, Sundefeld MLMM, Mattar NJ, Veronese LA. Detection of human papillomavirus (HPV) in tongue epidermoid carcinoma: clinical-pathological study in humans. In: Varma AK, Kowalski LP, Herter, NT, editors. *Oral oncology*. New

- Delhi: Macmillan Indian; 2002. p.127-130.
- 33 Kay P, Meehan K, Williamson A. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods* 2002;105(1):159-70.
 - 34 Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992;30(4):987-92.
 - 35 Campisi G, Giovannelli L, Calvino F, Matranga D, Colella G, Di Liberto C, et al. HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. *Oral Oncol* 2006;42(6):638-45.
 - 36 Sobin LH, Wittekind CH. Head and neck tumours. In: Sobin LH, Wittekind CH, editors. *TNM: classification of malignant tumours*. New York: Wiley-Liss; 1997. p. 20-4.
 - 37 World Health Organization. *International classification of diseases for oncology*. Geneva: World Health Organization; 1988.
 - 38 Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(14):1159-64.
 - 39 Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AI, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.
 - 40 De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer

- CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76(Pt4):1057-62.
- 41 Brestovac B, Harnett GB, Smith DW, Frost F, Shellam GR. Multiplex nested PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *J Clin Virol* 2005;33(2):116-22.
- 42 Soares CP, Benatti Neto C, Fregonezi PA, Teresa DB, Santos RT, Longatto Filho A, et al. Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. *Anal Quant Cytol Histol* 2003;25(1):19-24.



Anexos

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

OF. 164/2006
CEP
SFCD/bri


Araçatuba, 26 de outubro de 2006.

Referência Processo FOA 2005-00689

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto "DETECÇÃO DO HPV POR nPCR EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ASSOALHO BUCAL E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS, FATORES DE RISCO E SOBREVIDA" expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatório final em 23/03/2007.


Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho-Dekou
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. Glauco Issamu Miyahara
Araçatuba-SP-

Ciente, De acordo,

26/10/2006


Dr. Glauco Issamu Miyahara

ANEXO B - Normas para publicação da Revista Oral Oncology

Oral Oncology

Guide for Authors

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers. All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes). Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

It is essential to give a fax number and email address when submitting a manuscript. Articles must be written in good English.

Prior to Submission

Oral Oncology will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from www.icmje.org). Authors are advised to read these guidelines.

Previous Publication

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Ethics

For clinical trials, details of ethical committee approval and the type of informed consent should be stated. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Conflict of Interest

At the end of text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work.

Role of the Funding Source

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

Authorship and Acknowledgments

A covering letter, signed by **all** authors, should accompany the submitted manuscript. This letter must contain the statement that the manuscript has been "**read and approved by all authors**".

Authors are required to identify the contributions for which they are responsible. The author responsible for the integrity of the entire study should be identified. Please list the following phrases and beside each indicate the name(s) of the author(s) to whom they apply:

- 1 Guarantor of integrity of the entire study
- 2 Study concepts
- 3 Study design
- 4 Definition of intellectual content
- 5 Literature research
- 6 Clinical studies
- 7 Experimental studies
- 8 Data acquisition
- 9 Data analysis
- 10 Statistical analysis
- 11 Manuscript preparation
- 12 Manuscript editing
- 13 Manuscript review

Items that do not apply should be indicated.

In addition, written permission from the following parties should accompany the manuscript: a) those named in the acknowledgments who have been credited with a scientific contribution to the work, b) those cited in the manuscript as personal communications.

Copyright

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more

information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy
Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at NIHauthorrequest@elsevier.com that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Authors' Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Submission to *Oral Oncology* and *Oral Oncology EXTRA* proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal

(<http://authors.elsevier.com/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "Guide for Authors" section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

General Points

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://authors.elsevier.com/>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

Presentation of Manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Provide the following data on the title page:

Title: Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations: Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the

actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author: Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address: If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract: A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. A structured abstract is required. For this, a recent copy of the journal should be consulted. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Keywords: Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations: Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Text: This should start on the third page and should be subdivided into the following sections: Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, and Discussion.

References: Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. "Unpublished data" and "Personal communications" are not allowed. As an alternative, say in the text, for example, '(data not shown)' or '(Dr F.G. Tomlin, Karolinska Institute)'. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference numbers must always be given.

Number the references (numbers in square brackets) in the reference list in the order in which they appear in the text.

Examples:

1. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37(5):401-418.
2. Gullick WJ, Venter DJ. The c-erbB2 and its expression in human tumors. In: Waxman J, Sikora K, editors. *The molecular biology of cancer*. Oxford: Blackwell Scientific, 1989. p. 38-53.
3. Scully C, Cawson RA. *Medical Problems in Dentistry*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998

For more than 6 authors that first 6 should be listed followed by "et al". For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997; 277 : 927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html).

Figure Captions, Tables, Figures and Schemes

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

Preparation of Electronic Illustrations

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to colour reproduction in print.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations.

Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Note that photocopies of photographs are not acceptable.

Preparation of supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Proofs

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and

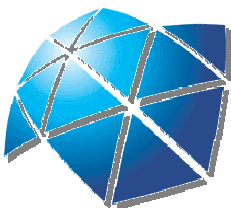
subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Author Enquiries

Visit the Author Gateway from Elsevier <http://authors.elsevier.com> for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you when an article's status changes. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, and answers to frequently asked questions.

ANEXO C - Ficha clínica individual



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Odontologia – Câmpus de Araçatuba
 Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica
 Disciplina de Estomatologia

Pesquisa: Detecção do HPV por nPCR em carcinomas epidermóides de assoalho bucal e sua correlação com variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida.

Aluna: Luciana Estevam Simonato

Nome do paciente:.....

Número do caso.....

Número do prontuário.....

1 - Sexo: (1) masculino (2) feminino.....

2 - Raça: (1) branca (2) não branca.....

3 - Idade.....

4 - Tabagista: (1) sim (2) não.....

5 - Etilista: (1) sim (2) não.....

6a - Categoria T: (1)To (2) Tis (3)T1 (4)T2 (5)T3 (6)T4 (7)Tx.....

6b - Categoria N: (1)No (2)N1 (3)N2a (4)N2b (5)N2c (6)N3 (7)Nx.....

6c - Categoria M: (1)Mo (2)M1 (3)Mx.....

7 - Anatomopatológico: (1) grau I (2) grau II (3) grau III.....

8 - Status: (1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer

(4) morte sem outras especificações (5) perda do segmento.....

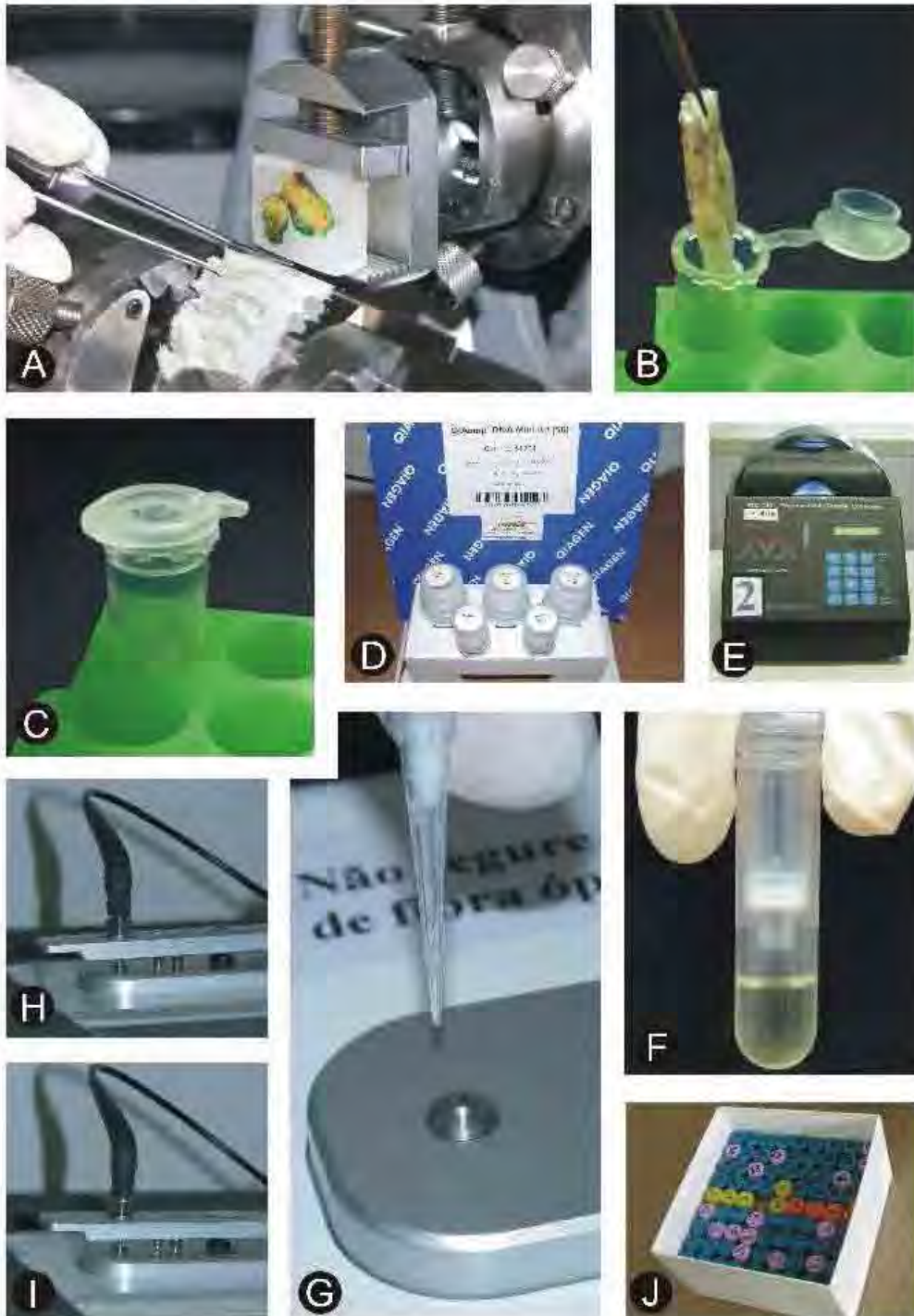
ANEXO D - Protocolo de extração de DNA com o sistema comercial QIAamp DNA minikit®

1. Transferir 25 mg de material parafinado para um tubo eppendorf esterilizado;
2. Adicionar 1200 μ L de xilol e agitar o tubo no vórtex por 1 minuto;
3. Centrifugar a 20800 rcf por 5 minutos em temperatura ambiente;
4. Desprezar o sobrenadante;
5. Adicionar 1200 μ L de etanol absoluto e agitar o tubo no vórtex por 1 minuto;
6. Centrifugar a 20800 rcf por 5 minutos em temperatura ambiente;
7. Desprezar o sobrenadante;
8. Adicionar 1200 μ L de etanol absoluto e agitar o tubo no vórtex por 1 minuto;
9. Centrifugar a 20800 rcf por 5 minutos em temperatura ambiente;
10. Desprezar o sobrenadante;
11. Colocar o tubo na secadora a 37°C durante 10 a 15 minutos, com as tampas abertas a fim de que o etanol remanescente evapore por completo, restando apenas o corpo de fundo no tubo;
12. Acrescentar 180 μ L de ATL (*Tissue Lysis Buffer*) para ressuspender o corpo de fundo e 20 μ L de proteinase K para lise completa do tecido;
13. Homogeneizar o tubo por 1 minuto no vórtex;
14. Incubar o tubo em banho-maria a 56°C durante 3 horas, agitando-o em intervalos de 1 hora por 1 minuto no vórtex;
15. Após esse período, centrifugar o tubo por 10 segundos a 20800 rcf e adicionar 200 μ L de AL (fornecido pelo kit), agitar o tubo por 15 segundos no vórtex e, em seguida, colocar na secadora a 70°C por 10 minutos, para que ocorra a inativação na proteinase K residual;
16. Acrescentar 100 μ L de etanol absoluto, agitar por 15 segundos no vórtex e centrifugar por 10 segundos a 20800 rcf;
17. Transferir a mistura para a coluna sobreposta ao tubo (fornecida pelo kit) e centrifugar durante 1 minuto a 6000 rcf, após a

- centrifugação, desprezar o filtrado;
18. Adicionar 500 μ L de AW1 (*Wash Buffer 1*) e centrifugar por 1 minuto a 6000 rcf, descartando o filtrado e o tubo;
 19. Adicionar 500 μ L de AW2 (*Wash Buffer 2*) e centrifugar por 3 minutos a 20800 rcf, descartando o filtrado e o tubo;
 20. Acrescentar 50 μ L de AE (Tris-HCl 10 mM, 0,5 mM EDTA, pH9.0) para eluir o DNA, aguardar 1 minuto e centrifugar por 1 minuto a 6000 rcf;
 21. Acrescentar 50 μ L de AE a coluna; repousar por 5 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 6000 rcf;
 22. Após a eluição do DNA, transferir a amostra para um tubo com rosca e armazenar a temperatura de -20°C .

ANEXO E - Ilustrações do preparo das amostras

- A -** Obtenção de 5 cortes de 10 μm de espessura de cada bloco, com o emprego de micrótomo histológico.
- B e C -** Acondicionamento dos cortes em tubos plásticos tipo eppendorf de 1,5 mL devidamente identificados.
- D -** Sistema comercial QIAamp DNA minikit® para extração do DNA.
- E -** Termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) utilizado na extração do DNA.
- F -** Tubo plástico tipo eppendorf contendo a solução de DNA extraído.
- G, H e I -** Quantificação do DNA obtido através do espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 UV-Vis).
- J -** Estocagem dos tubos contendo as amostras a -20°C .



ANEXO F - Esquema e ilustração da nPCR no genoma viral

[>gi|9627100|ref|NC_001526.1|](#) Human papillomavirus - 16, complete genome

ACTACAATAATTCATGTATAAAAATAAGGGCGTAACCGAAATCGGTTGAACCGAAACCGGTTAGTA
TAAAAGCAGACATTTTATGCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAG
AAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAATAACATGATATAATAATTAGAATGTGTGTA
CTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATA
TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTTAAAAGTTTATTCTAAAAATTAGTGAGTA
TAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAACCGTTGTGTGA
TTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAGCCACTGTGTCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGA
CAAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATC
ATCAAGAACACGTAGAGAAAACCCAGCTGTAATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATAT
ATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAG
GAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCAGGACAGAGCCATTACAATATTGTA
ACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTTCGGTGTGCGTACAAAAGCACACACGTAGACATTTCGT
ACTTTTGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAAACATAA
TCTACCATGGCTGATCCTGCAGGTACCAATGGGGAAAGAGGGTACGGGATGTAATGGATGGTTTTTAT
GTAGAGGCTGTAGTGGAAAAAAAACAGGGGATGCTATATCAGATGACGAGAACGAAAATGACAGT
GATACAGGTGAAGATTTGGTAGATTTTATAGTAAATGATAATGATTATTTAACACAGGCAGAAAACA
GAGACAGCACATGCGTTGTTTACTGCACAGGAAGCAAAAACAACATAGAGATGCAGTACAGGTTCTA
AAACGAAAGTATTTGGTAGTCCACTTAGTGATATTAGTGGATGTGTAGACAATAATATTAGTCCTA
GATTAAGCTATATGTATAGAAAAACAAGTAGAGTGCAAAAAGGAGATTATTTGAAAGCGAAG
ACAGCGGGTATGGCAATACTGAAGTGGAACTCAGCAGATGTTACAGGTAGAAAGGGCGCCATGAGA
CTGAAACACCATGTAGTCAGTATAGTGGTGGAAAGTGGGGTGGTTGCAGTCAGTACAGTAGTGGAA
GTGGGGGAGAGGGTGTAGTGAAGACACACTATATGCCAAAACACCCTTACAAAATATTTTAAATG
TACTAAAACTAGTAATGCAAAGGCAGCAATGTTAGCAAAAATTTAAAAGATTATACGGGGTGTAGTT
TTTCAGAATTAGTAAGACCATTTAAAAGTAATAAATCAACGTGTTGCGATTGGTGTATTGCTGCAT
TTGGACTTACACCCAGTATAGCTGACAGTATAAAAAACTATTACAACAATATTGTTTATATTTAC
ACATTCAAAGTTTAGCATGTTTATGGGGAATGGTGTGTTACTATTAGTAAGATATAAATGTGGAA
AAAATAGAGAAAACAATTGAAAAATTGCTGTCTAACTATTATGTGTGTCTCCAATGTGTATGATGA
TAGAGCCTCCAAAATTGCGTAGTACAGCAGCAGCATTATATTTGGTATAAAACAGGTATATCAAATA
TTAGTGAAGTGTATGGAGACACGCCAGAATGGATACAAAAGACAAAACAGTATTACAACATAGTTTTA
ATGATTGTACATTTGAATTATCACAGATGGTACAATGGGCCTACGATAATGACATAGTAGACGATA
GTGAAATTGCATATAAAATATGCACAATTGGCAGACACTAATAGTAATGCAAGTGCCTTTCTAAAAA
GTAATTCACAGGCAAAAATTGTAAGGATTGTGCAACAATGTGTAGACATTATAAACGAGCAGAAA
AAAAACAATGAGTATGAGTCAATGGATAAAATATAGATGTGATAGGGTAGATGATGGAGGTGATT
GGAAGCAAATTGTTATGTTTTTAAGGTATCAAGGTGTAGAGTTTATGTCATTTTTAACTGCATTAA
AAAGATTTTTGCAAGGCATACCTAAAAAAAATTGCATATTACTATATGTTGTCAGCTAACACAGGTA
AATCATTATTTGGTATGAGTTTAAAGAAATTTCTGCAAGGGTCTGTAATATGTTTTGTAAATTTCTA
AAAGCCATTTTTGGTTACAACCATTAGCAGATGCCAAAATAGGTATGTTAGATGATGTCTACAGTGC
CCTGTTGGAACACATAGATGACAATTTAAGAAATGCATTGGATGGAAAATTTAGTTTCTATGGATG
TAAAGCATAGACCATTGGTACAACATAAAATGCCCTCCATTATTAATTACATCTAACATTAATGCTG
GTACAGATTCTAGGTGGCCTTATTTACATAATAGATTGGTGGTGTTTACATTTCCATAATGAGTTTC
CATTTGACGAAAACGGAAATCCAGTGTATGAGCTTAATGATAAAGAACTGGAAAATCCTTTTTCTCAA
GGACGTGGTCCAGATTAAGTTTGCACGAGGACGAGGACAAGGAAAACGATGGAGACTCTTTGCCAA
CGTTTTAAATGTGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAAAATGATAGTACAGACCTACGTGAC
CATATAGACTATTGGAACACATGCGCCTAGAATGTGCTATTTATTAACAAGGCCAGAGAAATGGGA
TTTAAACATATTAACCACCAAGTGGTGCCAACACTGGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAAGCA
ATTGAACTGCAACTAACGTTAGAAAACAATATATAACTCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTA
CAAGACGTTAGCCTTGAAGTGTATTTAACTGCACCAACAGGATGTATAAAAAAACATGGATATACA
GTGGAAGTGCAGTTTGTATGGAGACATATGCAATACAATGCATTATACAAAACCTGGACACATATATAT
ATTTGTGAAGAAGCATCAGTAACTGTGGTAGAGGGTCAAGTTGACTATTATGGTTTATATTTATGTT
CATGAAGGAATACGAACATATTTTGTGAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATATAGTAAAAATAAA
GTATGGGAAGTTCATGCGGGTGGTCAGGTAATATTATGTCTACATCTGTGTTTAGCAGCAACGAA

GTATCCTCTCCTGAAATTATTAGGCAGCACTTGGCCAACCACCCCGCCGCGACCCATAACCAAAGCC
 GTCGCCTTGGGCACCGAAGAAACACAGACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACCCGGA
 AACCCCTGCCACACCACTAAGTTGTTGCACAGAGACTCAGTGGACAGTGCTCCAATCCTCACTGCA
 TTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAAGTGAATAGTAACACTACACCCATAGTACATTTAAAA
 GGTGATGCTAATACTTTAAAAATGTTAAGATATAGATTTAAAAAGCATTTGTACATTTGTACTGCA
 GTGTCGTCTACATGGCATTGGACAGGACATAATGTAAAAACATAAAAAGTGCAATTTGTTACACTTACA
 TATGATAGTGAATGGCAACGTGACCAATTTTTGTCTCAAGTTAAAAATACAAAAACTATTACAGTG
 TCTACTGGATTTATGTCTATATGACAAATCTTGATACTGCATCCACAACATTAAGGCGTGCTTTT
 TGCTTTGCTTTGTGTGCTTTTGTGTGTCTGCCTATTAATACGTCCGCTGCTTTTGTCTGTGTCTAC
 ATACACATCATTAAATAATATTGGTATTACTATTGTGGATAACAGCAGCCTCTGCGTTTAGGTGTTT
 TATTGTATATATTATATTTGTTTATATAACCATTATTTTAATACATACACATGCACGCTTTTAAAT
 TACATAATGTATATGTACATAATGTAATTGTTACATAAATTTGTTGTATACCATAACTTACTATTT
 TTTCTTTTTTATTTTTCATATAATAATTTTTTTTTTTTGTGTTGTTGTTGTTTAAATAAACTGTTA
 TTACTTAAACAATGCGACACAAAACGTTCTGCAAAAACGCACAAAACGTGCATCGGCTACCCAACTTTA
 TAAAACATGCAAAACAGGCAGGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAAACTAT
 TGCTGAACAAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGTGGGTTAGGAATTGGAACAGG
 GTCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTGGGAACAAGGCTCCACAGCTACAGATAC
 ACTTGCTCCTGTAAGACCCCTTTAACAGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTC
 TTTAGTGGAAGAACTAGTTTTTATTGATGCTGGTGACCAACATCTGTACCTTCCATTTCCCCAGA
 TGTATCAGGATTTAGTATTACTACTTCACTGATAACCACACCTGCTATATTAGATATTAATAATAC
 TGTTACTACTGTTACTACACATAATAATCCCCTTTCCTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAAC
 ACCTGCAGAACTGGAGGGCATTTTACACTTTCATCATCCACTATTAGTACACATAAATTATGAAGA
 AATTCCTATGGATACATTTATTGTTAGCACAAAACCTAACACAGTAAGTATAGCACACCCATACC
 AGGGTCTCGCCAGTGGCACGCTAGGATTATATAGTCGCACAAACACAACAGGTTAAAGTTGTAGA
 CCCTGCTTTTGAACCACTCCCACTAACTTATTACATATGATAATCCTGCATATGAAGGTATAGA
 TGTGGATAATACATTATATTTTTCTAGTAATGATAATAGTATTAATATAGCTCCAGATCCTGACTT
 TTTGGATATAGTTGCTTTACATAGGCCAGCATTAACTCTAGGCGTACTGGCATTAGGTACAGTAG
 AATTGGTAATAAACAACACTACGTACTCGTAGTGGAATACTATAGGTGCTAAGGTACATTATTA
 TTATGATTTAAGTACTATTGATCCTGCAGAGAATAAGAAATTAACAACATAACACCTTCTACATA
 TACTACCATTACATGCAGCCTCACCTTCTATTAATAATGGATTATATGATATTTATCAGCAGA
 TGACTTTATTACAGATACTTCTACAACCCCGTACCATCTGTACCTCTACATCTTTATCAGGTTA
 TATTCCTGCAAAATACAACAATTCCTTTTTGGTGGTGCATACAATATTCCTTTAGTATCAGGTCTGA
 TATACCCATTAATATAAAGTACCAAGCTCCTTTCATTAATTCCTATAGTTCCAGGGTCTCCACAATA
 TACAATTATTGCTGATGCAGGTGACTTTTTATTTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACG
 TAAACGTTTACCATATTTTTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGC
 CTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAAACATATATTATC
 ATGCAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAAACCTAACAAATA
 ACAAAATATTAGTTTCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACC
 CCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTTGGGCCT
 GTGTAGGTGTTGAGGTAGGTGCTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAA
 ATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAAT
 GTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTTGTGTTTAAATTTGGTTGCAAAACCCTATAGGGGAAC
 ACTGGGGCAAAGGATCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGT
 TAATAAACACAGTTATTTCAGGATGGTGATATGGTTCATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTA
 CATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAAATATCCAGATT
 ATATTAAAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTACGAAGGGAACAAAATGT
 TTGTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTACTGTTGGTGAAAATGTACCAGACGATTTATACATTA
 AAGGCTCTGGGTCTACTGCAAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCCTACAGCTACTGCTTCTATCG
 TTACCTCTGATGCCCAAAATATTCAATAAACCCTTATTGGTTACAACGAGCAGGGCCACAAATAATG
 GCATTTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAATATGTCA
 TATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGAC
 ATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTA
 TGACATACATACATTCTATGAATTCCTACTTTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCC
 CAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACCAGGCAATTTGCTTGTCAAAAAACATACAC
 CTCCAGCACCTAAAGAAGATGATCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAA
 AGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCTTTTAGGACGTAATAATTTTACTACAAGCAGGATTTGAAGG
 CCAAAACAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTACAACCTG
 CTAACCGCAAAAACGTAAGCTGTAAGTATTGTATGTATGTTGAATTAGTGTGTTGTTGTGTAT
 ATGTTTGTATGTGCTTGTATGTGCTTGTAAATATTAAGTTGTATGTGTGTTTGTATGTATGGTATA

ATAAACACGTGTGTATGTGTTTTTAAATGCTTGTGTAAC TATTGTGTCATGCAACATAAAATAAACT
 TATTGTTTTCAACACCTACTAATTGTGTTGTGGTTATTCATTGTATATAAACTATATTTGCTACATC
 CTGTTTTTTGTTTTATATATACTATATTTTTGTAGCGCCAGGCCATTTTGTAGCTTCAACCGAATTC
 GGTTGCATGCTTTTTGGCACAAAATGTGTTTTTTTTAAATAGTTCTATGTCAGCAACTATGGTTTAA
 ACTTGTACGTTTCCTGCTTGCCATGCGTGCCAAATCCCTGTTTTCTGACCTGCACTGCTTGCCAA
 CCATTCCATTGTTTTTTTACACTGCACTATGTGCAACTACTGAATCACTATGTACATTTGTGTCATAT
 AAAATAAATCACTATGCGCCAACGCCTTACATACCGCTGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTTTA
 ACTAACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTTTTAAACTTCTAAGGCCAACTAAAATGTCACCCTAGTT
 CATACATGAACTGTGTAAAGGTTAGTCATACATTGTTCAATTTGTAAAAC TGCACATGGGTGTGTGC
 AAACCGATTTTTGGGTTACACATTTACAAGCAACTTATATAATAATACTAA

MY11 - GCMCAGGGWC TATAAAYAATGG
 GCACAGGGCCAC AAT AATGG

452 pb

MY09 - CGTCCMARRGGAWACTGATC
 GCAGGMTRRCCTWTGACTAG (COMPLEMENTAR)
 GATCAGTWTCCRRITMGGACG (INVERSO)
 GATCAGTTTCCITTAGGACG

GP5+ - TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC
 TTTGTTACTGTTGTTGATACTAC

142 pb

GP6+ - GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
 CTTTTTATTTGACATTTAGTATAAG (COMPLEMENTAR)
 GAATATGATTTACAGTTTATTTTC (INVERSO)

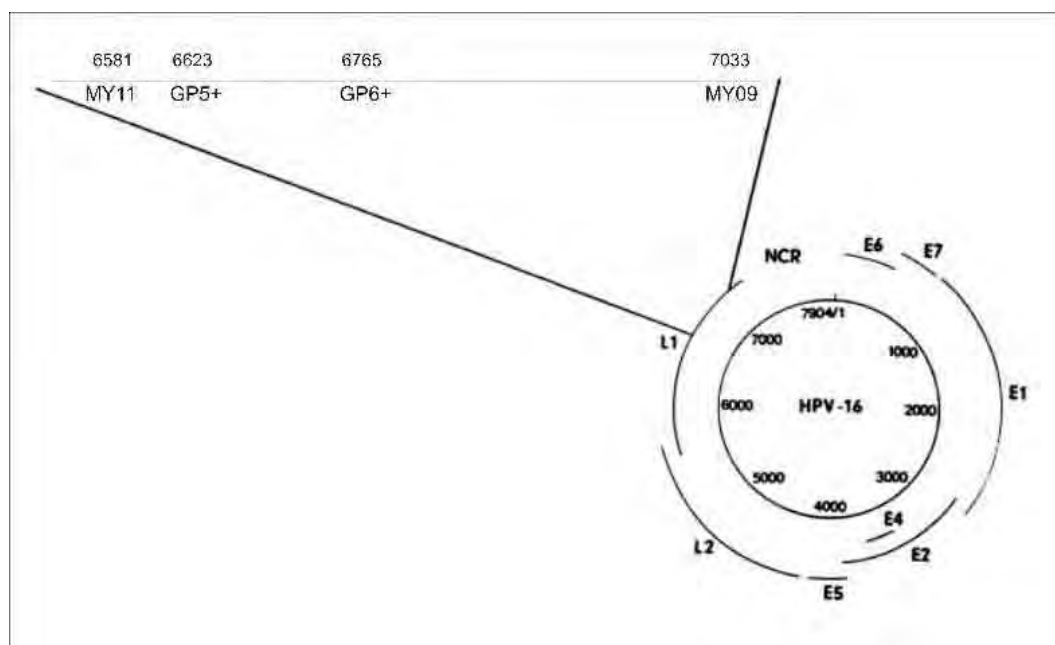


Ilustração mostrando as localizações dos oligonucleotídeos iniciadores MY11/MY09 e GP5+/GP6+ na região L1 do genoma viral

ANEXO G - PCR para amplificação do gene controle

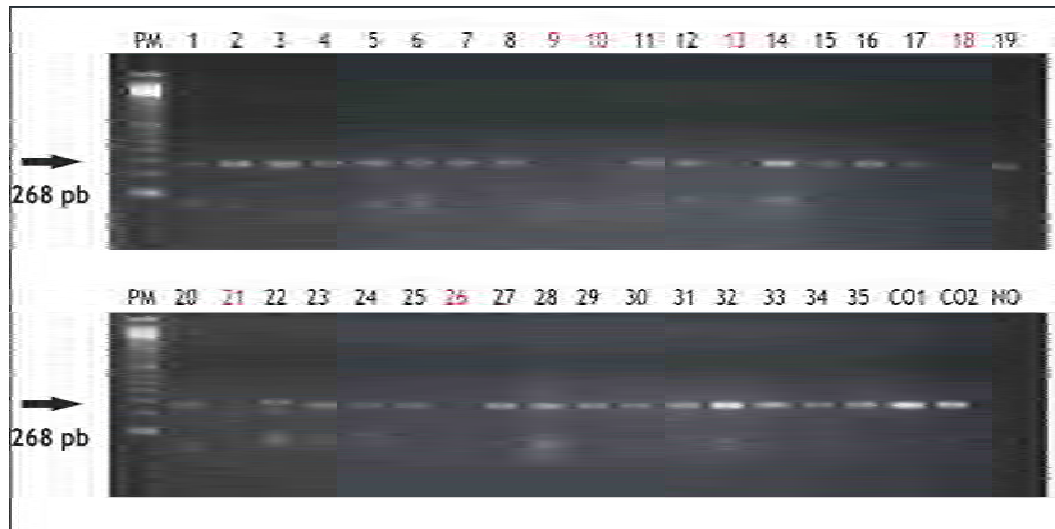


Figura 3 Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação da α -globina (268 pb) das 35 amostras de carcinoma epidermóide de assoalho bucal

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