



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Araçatuba

CAROLLINE VITOR ALVES FRANCO

**COMPARAÇÃO DA TAXA DE DETECÇÃO DO DNA DO EBV EM
AMOSTRAS DE SALIVA TOTAL E CÉLULAS EXFOLIADAS DE
PACIENTES COM LEUCOPLASIA BUCAL ATRAVÉS DA nPCR**

**ARAÇATUBA – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Araçatuba

CAROLLINE VITOR ALVES FRANCO

**COMPARAÇÃO DA TAXA DE DETECÇÃO DO DNA DO EBV EM
AMOSTRAS DE SALIVA TOTAL E CÉLULAS EXFOLIADAS DE
PACIENTES COM LEUCOPLASIA BUCAL ATRAVÉS DA nPCR**

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

Orientador: Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara

Coorientador: Prof. Dr. Eder Ricardo Biasoli

**ARAÇATUBA – SP
2016**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho principalmente à minha família, meus pais Claudiney e Renata que sempre me servem de inspiração diária, que são exemplos de dedicação e apoio, que me colocam em primeiro lugar em tudo que podem e fazem o possível e o impossível para me dar o melhor e realizar meus sonhos. Não poderia desejar mais ou diferente de tudo que tenho e conquistei hoje. Não seria quem eu sou, não teria o que tenho, nem desejaria o que desejo se não tivesse essa certeza que o amor de vocês me dá. Dedico à vocês mais essa conquista, pois ela também é de vocês e agradeço por serem meus pais, mas principalmente meus professores e amigos. Vocês são a razão de tudo!

Aos meus irmãos William e Júnior que são a continuação dessa base, que foram meus primeiros e mais fiéis amigos. Não tem nada no mundo que eu não faria por vocês.

Agradeço, em especial, meu irmão Junior, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, servindo-me de conselheiro e de melhor amigo, e que sempre será meu eterno parceiro nos maiores festivais de música. Agradeço pelo apoio incondicional em todos os relacionamentos, atuais e futuros, e confio minha vida a você. Sempre poderei contar contigo e sua incalculável e inestimável sabedoria e conhecimento. Pegue todos os pokemons que houver nesta vida. Amote! E ao melhor irmão William, obrigado por ser meu irmão e meu primeiro amigo. Não há nada no mundo que eu não faria por você.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Glauco Issamu Miyahara e coorientador Éder Ricardo Biasoli, os quais estiveram presentes desde o início dessa jornada me guiando e tornando-a, bem como a mim, o mais completa possível. À todos os funcionários do Centro de Oncologia Bucal (COB) que estiveram sempre presentes me ensinando o sentido real de multidisciplinaridade e respeito.

Ao meu namorado José Eduardo Martins por toda a paciência, apoio e companheirismo durante boa parte desse processo tanto nos momentos bons como nos ruins.

À todos os meus amigos, Ana Maria, Aviva Belizário, Janayna Resende e Tatianne Arantes que me apoiaram e suportaram, perturbaram e me entenderam seja na presença ou na ausência, na loucura ou sanidade. Quando eu for rica e famosa me lembrarei de vocês.

Principalmente ao Carlos Eduardo a quem eu tive o privilégio de conhecer nos últimos anos dessa jornada e que se tornou parte essencial dela e fez valer a cada segundo a palavra amigo. Sei que te levarei comigo além, muito além daqui e dessa experiência.

Assim como a Anne Faria, mais conhecida como mamis, quem praticamente me "adotou" nesses anos todos e se tornou mais do que uma amiga e sempre esteve lá pra me corrigir quando eu era grossa demais com as pessoas e me defender quando os outros diziam que era grossa demais. Aonde quer que eu vá sempre levarei você e nossa pequena Lolo comigo nas minhas melhores memórias.

À Lígia, Rúbia e Maryelisa que tanto me ensinaram e ajudaram em todo esse projeto e sem as quais a realização do mesmo seria impossível.

Por fim agradeço a todos os mestres e funcionários que não só fazem parte dessa instituição, mas sem os quais a mesma não seria capaz de ser ela assim como eu sem vocês não seria eu. Obrigada pelas lições aprendidas em sala de aula, em clínica e principalmente àquelas que me foram dadas fora delas.

FRANCO, C. V. A. **Comparação da taxa de detecção do DNA do EBV em amostras de saliva total e células exfoliadas de pacientes com Leucoplasia bucal através da nPCR.** 2016. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a taxa de detecção do DNA do Epstein Barr vírus (EBV) em amostras de saliva total e células exfoliadas, em 30 pacientes com leucoplasia bucal, através da nPCR. Na fase laboratorial realizou-se a extração de DNA das amostras segundo as instruções do Kit de extração de DNA QIAamp® DNA mini kit e todas as amostras foram submetidas à espectrofotometria para verificação da presença e integridade do DNA. Posteriormente utilizou-se as PCRs para β -globina, com os primers PCO3 e PCO4 (260pb), seguindo com a análise através da eletroforese em gel de agarose 2% para a verificação da presença do DNA humano. Foi executada nPCR com os ologonucleotídeos iniciadores para o DNA do EBV. Todas as amostras foram testadas em duplicata e os produtos da nPCR submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Utilizou-se os testes estatísticos (Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher) com nível de significância de 5%. Obteve-se como resultado que 80% das amostras (24 pacientes) de citobrush foram positivas para a presença do EBV. Das amostras positivas, 84% eram homens, com média de idade de 59 anos. Já na análise quanto as amostras de saliva, a positividade foi de 77% (23 pacientes) mantendo também a prevalência do gênero masculino com 69,5% dos casos (16 pacientes). No entanto a pesquisa não apresentou significância estatística na comparação da taxa de detecção do DNA do Epstein-Barr vírus nas amostras avaliadas de pacientes com leucoplasia bucal

Palavras - Chave: Herpes vírus Humano 4. Leucoplasia Oral. CEC.

FRANCO, C. V. A. **Comparison of the detection rate of EBV DNA in total saliva and exfoliated cells samples of patients with Oral Leukoplakia through nPCR.** 2016. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

The aim of this essay was to compare the detection rate of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in total saliva samples with samples of exfoliated cells, obtained through the use of cytobrush of patients with oral leukoplakia, through n-PCR. In the laboratory phase, the DNA was extracted from the samples according to the instructions of the DNA extraction Kit QIAamp® DNA mini kit and all samples were submitted to spectrophotometry to verify presence and integrity of the DNA. Subsequently the PCRs were performed for β -globin, with primers PCO3 and PCO4 (260pb). To verify the presence of human DNA, an analysis was performed using 2% agarose gel electrophoresis. n-PCR was performed with initiator oligonucleotides for the EBV's DNA. All samples were tested in duplicate and the n-PCR products were subjected to 8% polyacrylamide gel electrophoresis. It was verified the existence of association between variables of both groups studied by applying statistical tests (Chi-square or Fisher's exact Test) with a significance level of 5%. Saliva and exfoliated cells samples collected in the laboratory phase for DNA extraction and PCR for β -globin, which was positive for all samples, showing a good quality DNA. EBV's reaction standardization revealed that 80% of the samples (24 patients) of cytobrush were positive for the presence of the virus. In this analysis the prevalence was in males who presented positivity in 84% of cases (16 patients). As for the analysis of the saliva samples, the positivity was 77% (23 patients) also maintaining the prevalence of male with 69.5% of cases (16 patients). However the research showed no statistical significance in the comparison of the detection rate of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in samples evaluated of patients with oral leukoplakia.

Keywords: Herpes virus Human 4. Leukoplakia. OSSC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resultado da amplificação do EBV (100pb) por n-PCR de 17 amostras de saliva total	21
Figura 2 -	Resultado da amplificação do EBV (100pb) por n-PCR de 13 amostras de saliva total	22
Figura 3 -	Resultado da amplificação do EBV (100pb) por n-PCR de 17 amostras de citobrush	22
Figura 4 -	Resultado da amplificação do EBV (100pb) por n-PCR de 13 amostras de citobrush	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Detecção do EBV em citobrush	23
Gráfico 2 - Detecção do EBV em saliva	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teste de Qui-quadrado para comparação entre as duas fontes de materiais	24
Tabela 2 -	Teste de Qui-quadrado com o nível de significância de 5%, fazendo comparação entre o sexo e amostras positivas e negativas para o DNA do EBV	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 Critério para seleção	17
3.2 Coleta de dados e materiais.....	17
3.3 Extração de DNA.....	18
3.4 PCR para gene humano controle.....	19
3.5 nPCR para amplificação do EBV.....	20
3.6 Análise estatística	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO.....	30
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas da cavidade oral são um sério problema de saúde pública tanto no Brasil como em todo o mundo. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde de 2016 (INCA), o câncer bucal é a sétima neoplasia maligna mais frequente no Brasil e suas taxas de incidência e consequente mortalidade estão entre as mais elevadas do mundo sendo esperados cerca de aproximadamente 16 mil novos casos para esse ano.

Dentre os vários tipos de patologia, o carcinoma espinocelular (CEC) é amplamente reconhecido como o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço, representando mais de 90% dos casos, com uma taxa de sobrevida de cerca de 50% em cinco anos (LUO et al., 2007; LIU et al., 2010). Baseado nas informações atualmente disponíveis, pode-se afirmar que existem diferentes mecanismos responsáveis pela carcinogênese. Dentre eles, a predisposição genética, e a ação de fatores de risco, incluindo tabaco e subprodutos do álcool, que podem variar de acordo com as diferenças geográficas, culturais, étnicas e sócio-econômicas (BAGAN et al., 2007; CRUZ et al., 97). Uma vez que os cânceres de boca têm sido observados em pequena porção de pacientes sem os fatores de risco, causas como a interação com alguns vírus, como o Epstein-Barr (EBV) e o papilomavírus (HPV), vem sendo investigadas. Esses principais fatores de risco são os mesmos associados à leucoplasia bucal (LO), que é a lesão cancerizável de boca mais comum, que pode levar ao desenvolvimento do CEC (YANG et al.,2007).

A leucoplasia bucal é definida como uma mancha ou placa que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença, segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1978). Este termo tem conceituação estritamente clínica e não implica uma alteração

histopatológica específica, portanto, seu padrão de diagnóstico passa a não depender tanto de aparências definidas, mas sim da exclusão de outras lesões que se apresentam como placas brancas orais. As regiões mais acometidas são: língua, mucosa jugal, palato duro, assoalho de boca e a gengiva. Apresentam etiologia variada, sendo relacionada ao tabaco, álcool, deficiências vitamínicas, distúrbios endócrinos, radiação ultravioleta e infecções (BALDAN, 2005).

A doença ocorre com maior frequência no sexo masculino, após a quarta década de vida sendo até seis vezes mais frequente entre fumantes (AMAGASA et al., 2011; DIETRICH et al., 2004; LAPTHANASUPKUL et al., 2007; MASEREJIAN et al., 2006). Trata-se de um grupo de lesões heterogêneas, das quais 5% a 15% são classificadas histopatologicamente como displasias (PINDBORG et al., 1997; SUAREZ et al., 1998; SUBDO; REITH, 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007). Na literatura, há controvérsias em relação à incidência das leucoplasias que se convertem em carcinoma espinocelular, para a qual o índice de malignizações varia de 1,4% a 36%, em um período de 1 a 30 anos (CARINCI et al., 2005; KUROKAWA et al., 2002; LEE et al., 2000; SAITO et al., 2001; SILVERMAN et al., 1984; WARNAKULASURIYA, 2000). Sua taxa de transformação maligna varia de acordo com a localização, características clínicas, grau de displasia e fatores etiológicos. Uma vez que os fatores de risco para alteração maligna de LO parecem ser imprevisíveis e, como não são todas que desenvolvem o carcinoma espinocelular (CEC), continua a ser um desafio para os pesquisadores tratar esta doença (YANG et al., 2010).

Desde sua descoberta em 1964 o EBV tem sido associado a vários carcinomas humanos, assim como a uma grande variedade de lesões benignas e

potencialmente malignas, como é o caso da leucoplasia. (KIS et al., 2009; SHAH; YOUNG, 2009).

O EBV é um herpes vírus linfotrófico implicado na patogênese de uma série de tumores humanos, tanto de origem epitelial como linfóide, incluindo o linfoma de Burkitt, distúrbios pós-transplantes linfoproliferativo, carcinoma nasofaríngeo indiferenciado e linfoma de Hodgkin's (KHAN et al., 2011). Esse vírus composto de uma dupla cadeia de DNA, pertencente à família *herpesviridae*, infecta cerca de 95% da população mundial adulta de forma assintomática ao longo de toda a vida do hospedeiro (DOLCETTI; MASUCCI, 2003). Possui dois subtipos (1 e 2 ou A e B) e sua transmissão ocorre com o contato oral, principalmente durante o beijo (HIGA et al., 2002; HIGGINS et al., 2007). A infecção primária ocorre nos três primeiros anos de vida de forma subclínica. Todavia, quando adolescentes são acometidos por essa doença, frequentemente desenvolvem a mononucleose infecciosa, doença aguda autolimitada (CLEMENS, 2006; HIGGINS et al., 2007; MAO; SMITH, 1993; SHIMAKAGE et al., 2002).

Após a infecção primária, o vírus estabelece uma infecção latente em uma pequena proporção de linfócitos B, bem como em células epiteliais da orofaringe e de glândulas salivares. Periodicamente, os vírus se replicam na orofaringe ou no epitélio de glândulas salivares e depois são excretados na saliva (KIS et al., 2009).

Na literatura, há uma discrepância notável nos resultados de estudos realizados em lesões bucais em busca de infecção pelo EBV. Isso se deve à dificuldade de comparar resultados, devido às diferentes técnicas empregadas, pois inúmeras são as técnicas utilizadas para detecção do vírus, dentre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), a nested-PCR (n-PCR), a imunistoquímica e as técnicas de hibridização. Outra discrepância quanto à detecção do EBV refere-se à

variação conforme a fonte do material e sua qualidade na coleta do mesmo (CIANFRIGLIA et al., 2006).

A PCR é uma técnica de biologia molecular amplamente utilizada para a identificação do EBV em biópsia de lesões orais ou mesmo em saliva. Consiste em um método de amplificação *in vitro* (geração de múltiplas cópias) de DNA, que pode ser realizado a partir de quantidades reduzidas de amostra. Por sua vez, a n-PCR é uma variação da PCR e visa aumentar a especificidade e eficiência da amplificação do DNA alvo, por compreender duas etapas de síntese de DNA, sendo que o material produzido na primeira etapa serve de molde para a segunda (EVANDER et al., 1992).

Assim, por meio dessas diferentes técnicas, alguns pesquisadores buscam comprovar a presença do vírus EBV em diversas lesões orais e não orais. (SAND et al., 2002). Para tanto, utilizando a técnica da n-PCR, analisaram a presença do EBV em amostras teciduais parafinadas de portadores de líquen plano bucal (LPB) e encontraram uma prevalência do vírus. Por meio da mesma técnica, em estudo que submeteu pacientes com leucoplasia pilosa HIV positivos à biópsia, obteve-se a presença do vírus em 76% dos casos. Contudo, 50% das amostras analisadas de pacientes HIV negativos sem a lesão mostraram-se positivas para o EBV. Isso demonstra a maior incidência do EBV em pacientes HIV positivos quando comparados ao HIV negativos (GONZALES et al., 2010). Em 60% dos casos na leucoplasia verrucosa proliferativa, e 40% de casos CEC, também detectou-se a presença do vírus em estudo realizado (BAGAN et al., 2008). Esses dados diferem com o resultado apresentado em outro estudo, no qual os pacientes portadores de CEC apresentaram uma maior prevalência do vírus quando comparados ao líquen plano e a leucoplasia oral (KIS et al., 2009). Evidencia-se desse modo a

discrepância de dados e a falta de consenso que podemos encontrar na literatura médico-clínica.

O papel do EBV nos carcinomas fornece informações relevantes para a compreensão da patogênese de vários tumores (SHAH; YOUNG, 2009). Porém, seu possível papel em diversas lesões como, por exemplo, a leucoplasia oral, e sítios de localização ainda é controverso, evidenciando a importância da realização deste trabalho.

2 OBJETIVO

Comparar as taxas de detecção do DNA viral em amostras de saliva total com amostras de células *exfoliadas*, de pacientes com leucoplasia bucal, por meio da nPCR.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP com o número do protocolo “Processo FOA-01034/2011.” (ANEXO A).

3.1 Critério para seleção

Pacientes da disciplina Estomatologia da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, com leucoplasia bucal, confirmados por meio de exame histopatológico.

3.2 Coleta de dados e materiais

Utilizando-se de formulário próprio, foram colhidas informações existentes nos prontuários dos pacientes. Depois de selecionados os casos, foram realizados os procedimentos laboratoriais, conforme descrição abaixo:

1. Preliminarmente, os pacientes submetidos à coleta da amostra de saliva também foram orientados novamente a evitar o consumo de qualquer alimento ou bebida 30 minutos antes da coleta a ser realizada. Para a obtenção das amostras de saliva foi solicitado ao paciente que eliminasse a saliva em um tubo falcon de 15 ml pelo período de 5 a 10 minutos (no mínimo 5ml). As amostras foram distribuídas em 5

ependorfs de 2ml cada, e identificadas por meio de um código e armazenadas em freezer -20° C para posterior procedimento laboratorial.

2. Num segundo momento, foram realizadas as coletas de células *exfoliadas* mediante utilização do citobrush. No processo de coleta da amostra, esfregou-se cada citobrush firmemente de 5 a 10 vezes na mucosa jugal, borda lateral da língua e orofaringe bilateralmente e colocou-se o citobrush em um tubo eppendorf de 2 ml contendo 300 microlitros de TE ou PBS. As amostras foram identificadas mediante um código e armazenadas em freezer -20° C para posterior procedimento laboratorial.

3.3 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.

O DNA obtido de todos os materiais foi submetido à espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) para confirmação da presença e integridade do DNA. Posteriormente foram realizadas as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene controle da β -globina humana e para o gene do EBV.

3.4 PCR para gene humano controle

Na realização do PCR para o gene controle da β -globina foram utilizados os oligonucleotídeos PCO3 e PCO4 (110 pares de base - pb) (NONOGAKI S et al., 2005).

Após a mistura dos componentes em um fluxo-laminar (Heto-HolterTivo HV PCR, Dinamarca), foram adicionados 5 microlitros do DNA de cada amostra, totalizando um volume final de 25 microlitros. Como controle positivo para o gene da β -globina utilizamos uma amostra de sangue previamente testada e como controle negativo uma amostra contendo somente o mix.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador (Peltier Effect Cycling modelo PTC – 100, MJ Research, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, com extensão final a 72° C por 8 minutos. Para o tecido e para o plasma, a temperatura de anelamento varia para 53 ° C e 50 ° C, respectivamente.

Para verificação da presença do DNA humano foi feita a análise com o auxílio da eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão 1x TBE (Fonte Eletroforética - Amersham Pharmacia Biotech modelo EP3501, Suécia), durante 75 minutos a 100 volts. A visualização, após coloração com brometo de etídeo, foi feita sob luz ultravioleta e a documentação com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Após a confirmação da presença e integridade do DNA genômico, as amostras foram submetidas à pesquisa do gene do EBV por meio da nPCR com oligonucleotídeos iniciadores para o DNA do EBV. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.5 nPCR para amplificação do EBV

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

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

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

3.6 Análise estatística

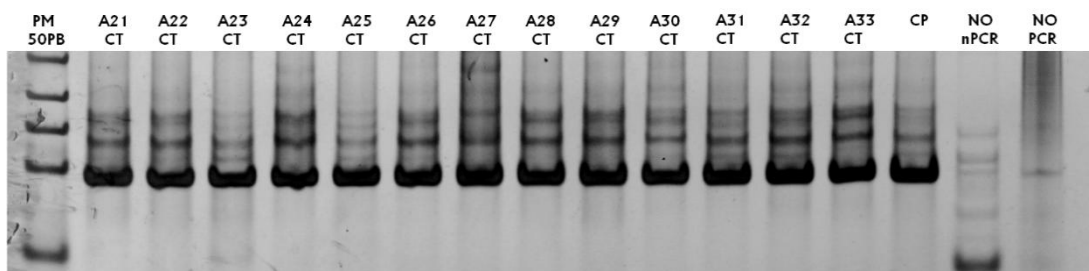
A existência de associação entre as variáveis dos dois grupos estudados foi verificada pela aplicação de testes estatísticos (Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher) com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Dentre os 30 pacientes triados, 63,3% (n=19) eram do sexo masculino e 36,7% do sexo feminino (n=11). Tabulamos os pacientes participantes da pesquisa durante os 6 meses, de acordo com nome, idade, diagnóstico e sexo. Além de visualizar a prevalência masculina quanto à incidência de leucoplasia, também obtivemos uma média etária dos pacientes da pesquisa de aproximadamente 59 anos.

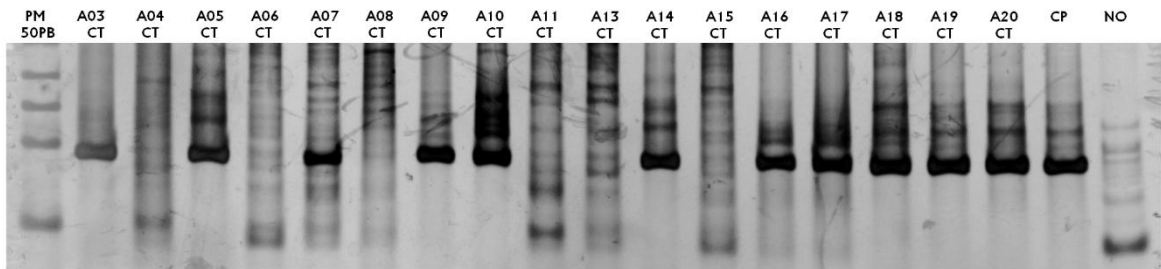
A evidenciação das bandas foi realizada por coloração com de nitrato de prata, como podemos visualizar nas figuras 1, 2, 3 e 4 abaixo, a fim de contabilizar e analisar as amostras que apresentavam positividade para o vírus EBV. Visualizamos o resultado da amplificação do EBV (100pb) de 30 amostras de saliva total (figura 1 e 2), 30 amostras de citobrush (figura 3 e 4) respectivamente.

Figura 1 - Resultado da amplificação do EBV (100pb) por nPCR de 13 amostras de saliva total



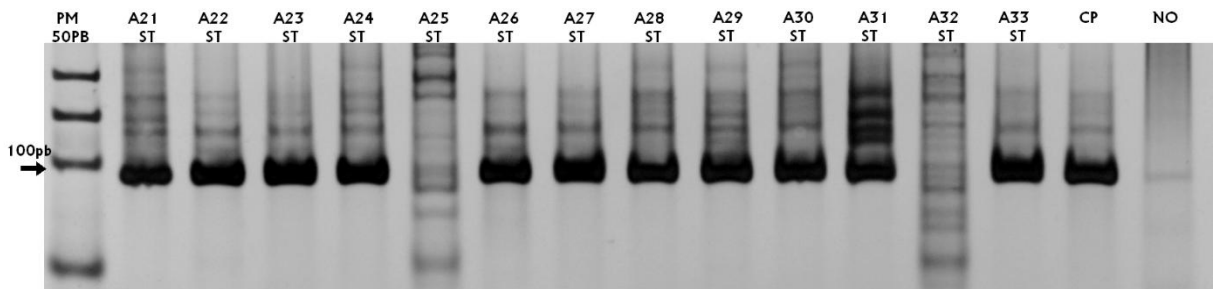
PM= peso molecular; CT= citobrush; CP= controle positivo; NO= controle negativo
 Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 2 - Resultado da amplificação do EBV (100pb) por nPCR de 17 amostras de saliva total



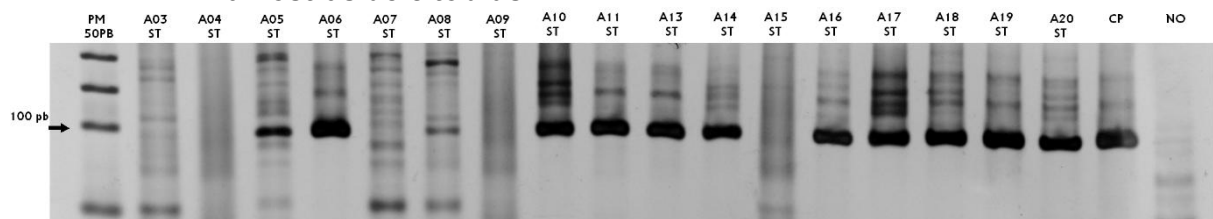
PM= peso molecular; CT= citobrush; CP= controle positivo; NO= controle negativo
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 3 - Resultado da amplificação do EBV (100pb) por nPCR de 13 amostras de citobrush



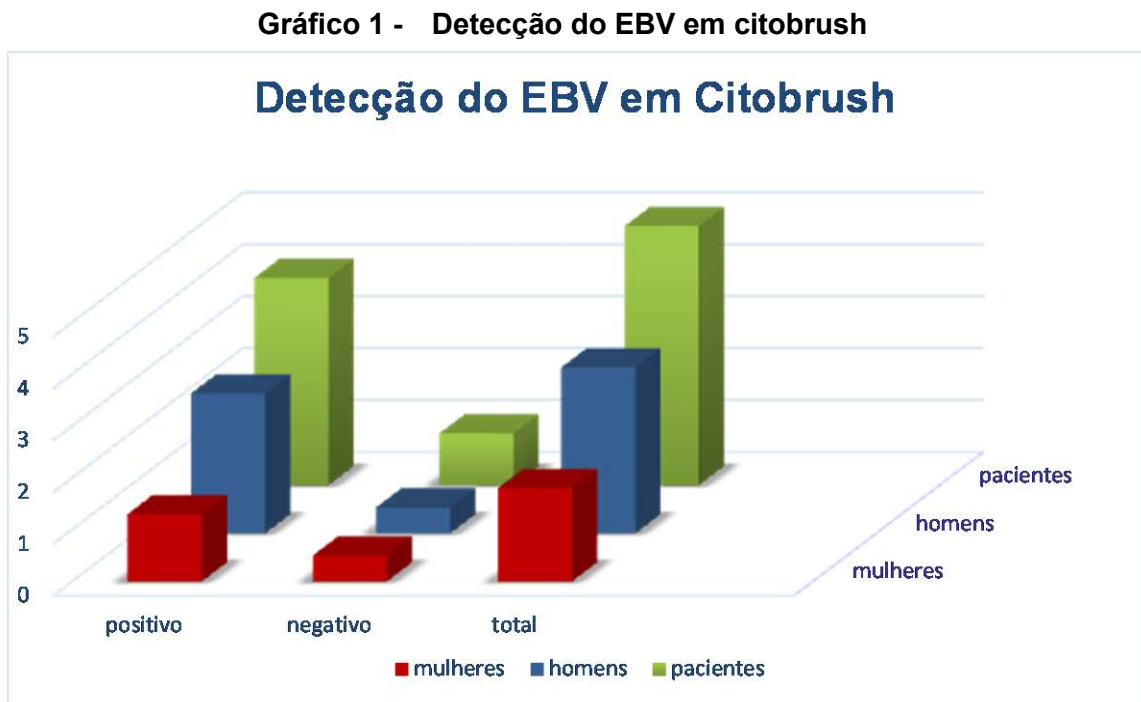
PM= peso molecular; ST=saliva; CP= controle positivo; NO= controle negativo
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 4 - Resultado da amplificação do EBV (100pb) por nPCR de 17 amostras de citobrush



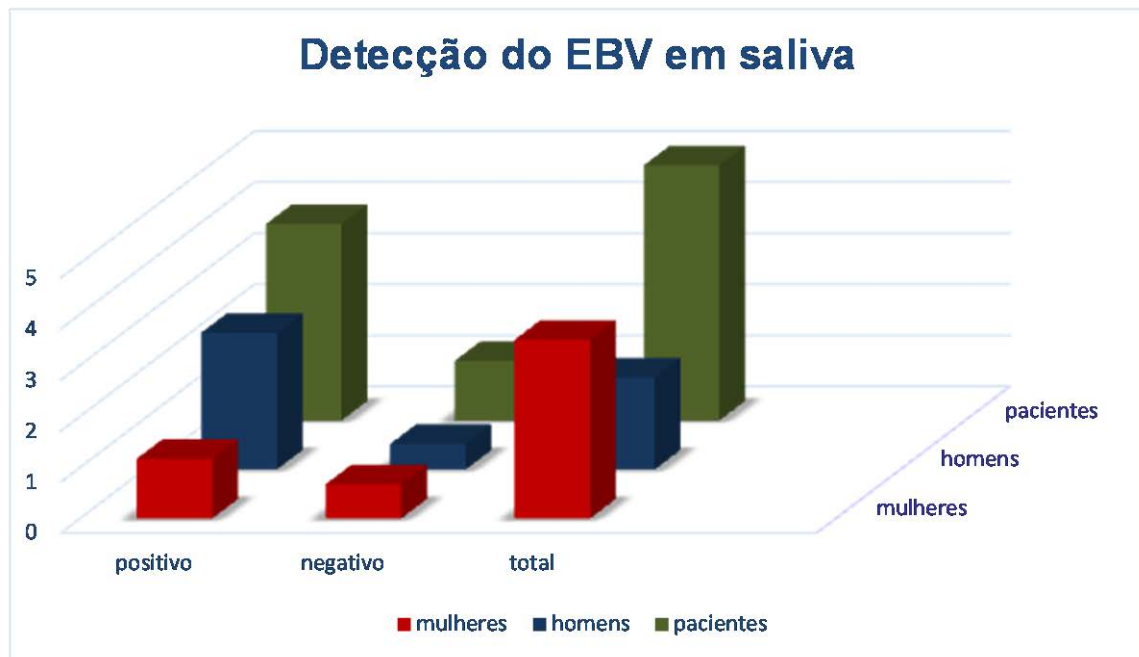
PM= peso molecular; ST=saliva; CP= controle positivo; NO= controle negativo
Fonte: Elaborada pelo autor

A padronização de reação do EBV revelou que 80% das amostras (24 pacientes) de *citobrush* foram positivas para a presença do vírus. No âmbito dessa análise, prevaleceu a incidência quanto ao sexo masculino que apresentou positividade em 66,7% dos casos (16 pacientes), como exemplificado no Gráfico 1.



Já na análise referente à amostra de saliva, a positividade foi de 76,7% (23 pacientes), mantendo também a prevalência do gênero masculino com 69,5% dos casos (16 pacientes) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Detecção do EBV em saliva



Realizamos a comparação entre as fontes de coleta do material e a presença do EBV, bem como relacionamos esse dado com a separação de gênero, como pode ser observado nas tabelas 1 e 2 abaixo:

Tabela 1 - Teste de Qui-quadrado para comparação entre as duas fontes de materiais

	EBV + (%)	EBV - (%)	p*
Citobrush	24(80)	6(20)	0,517
Saliva	23(76,6)	7(23,3)	

p*= Nível de significância estatística

Tabela 2 - Teste de Qui-quadrado com o nível de significância de 5%, fazendo comparação entre o sexo e amostras positivas e negativas para o DNA do EBV

Sexo	Pacientes (n= 30)	Citobrush EBV		p*	Saliva EBV		p*
	n (%)	+	-		+	-	
Masculino	19 (63,3)	16 (66,7)	3	0,448	16 (69,6)	3	0,199
Feminino	11 (36,7)	8 (33,3)	3		7 (30,4)	4	
Total	30	24	6		23	7	

p*= Nível de significância estatística

5 DISCUSSÃO

Em relação aos pacientes portadores de leucoplasia oral e as fontes estudadas, esperava-se, como de fato ocorreu, encontrar altas taxas de detecção para o EBV, tanto nas amostras de células exfoliadas, que foi de 80%, quanto nas amostras de saliva que foram de 77%. Pois, segundo estudo de Walling et al. (2001), essa alta taxa de detecção do EBV na saliva ocorre devido ao fato da saliva ser considerada uma das principais fontes de disseminação do vírus. A alta positividade viral encontrada nas amostras de células exfoliadas sugere que o vírus possa estar em seu ciclo replicativo, o qual pode ser detectado nas camadas superficiais do epitélio.

Vieira et al. (2015) e Saygun et al. (2005), em seus estudos, verificaram as taxas de detecção do EBV em pacientes não portadores de líquen plano bucal observando que as taxas de infecção pelo EBV em indivíduos saudáveis podem variar de 0% a 100%. Ammatuna et al. (1998) obtiveram a positividade para o EBV em 15% das amostras de saliva e em 30% das amostras de células exfoliadas de indivíduos saudáveis. Porém, mesmo as taxas sendo altas, não há significância estatística desta relação, a qual também não foi encontrada neste trabalho aqui apresentado.

Quanto às características clínicas, obteve-se a prevalência masculina no diagnóstico de leucoplasia oral não divergindo daquelas encontradas na literatura. Também observou-se predominância do sexo masculino na análise das amostras que apresentaram positividade para o EBV em ambas as fontes estudadas, corroborando com o estudo de Kis et al. (2009), cujos resultados estão em consonância com o estudo aqui apresentado. Tal resultado, no entanto, contrapõe-se ao estudo de Higgins et al. (2007), que obteve uma maior soroprevalência do

EBV no sexo feminino de 79%, bem como no estudo de Vieira et al. (2015), no qual essa prevalência foi de 83.3%.

Outrossim, Sand et al. (2002) relatou não haver diferenças entre o sexo quanto à prevalência do EBV, o que evidencia a contrariedade quanto a esta variável. Ainda de acordo com Maeda et al. (1998) maiores amostras poderiam apresentar resultados diferentes. Segundo esse último autor, a diversidade das localizações geográficas onde os estudos foram realizados provoca alterações significativas devido a fatores locais, culturais e diferenciação dos hábitos associados ao mesmo sexo, levando a uma diferenciação dessa taxa de prevalência.

Os dados aqui apresentados vão de acordo com o estudo realizado por Gonzales-Moles et al. (2002), em que foram avaliados 21 pacientes HIV+ adultos que clinicamente apresentavam leucoplasia pilosa oral, por meio da nPCR, detectando-se infecção pelo EBV em 76% dos casos.

De maneira análoga, Bagan et al. (2008) realizou um trabalho a fim de correlacionar o vírus às lesões orais. Os 10 pacientes participantes de um grupo da pesquisa apresentavam leucoplasia verrucosa proliferativa. Já os pacientes considerados como controle possuíam mucosa oral saudável. Dentre os dez pacientes estudados, seis apresentaram infecção pelo EBV. Em outras palavras, o vírus foi encontrado em 60% dos casos, mantendo a média estatística semelhante a este estudo, de acordo com o que verifica-se na literatura que utiliza técnicas laboratoriais semelhantes. Contudo, o número de participantes da pesquisa não pode sustentar a afirmação de que o EBV possui papel no desenvolvimento das lesões. Fator, que se analisado, também pode ter influenciado este estudo.

As taxas de prevalência viral foram superiores a de estudos realizados por Sand et al. (2002) e por Kis et al. (2009), que abordaram o papel do EBV no carcinoma espinocelular, leucoplasia e líquen plano bucal. Das lesões mencionadas, tais autores encontraram a presença do vírus em 73.8% dos pacientes, 29.5% e 46,6% respectivamente, através da técnica da nPCR. No estudo de Yildirim et al. (2011), utilizando a técnica da imunohistoquímica, encontrou-se a prevalência do EBV em 35% das amostras teciduais de líquen plano bucal, dado inferior ao apresentado.

Acredita-se que essa alta taxa viral apresentada neste trabalho que realizamos, quando comparada a outros estudos que utilizaram a mesma técnica, deve-se ao fato da utilização de tecido fresco em vez da utilização de tecidos parafinizados. É sabido que o uso deste último material pode ocasionar uma degradação do DNA devido a sua fixação em formalina e assim, comprometer os dados finais.

Acrescenta-se a isso as inúmeras possibilidades de técnicas que podem ser utilizadas para detecção do vírus, dentre elas, a reação em cadeia da polimerase (PCR), a nested-PCR (n-PCR), a imunohistoquímica e as técnicas de hibridização, visto que o emprego do método da n-PCR, utilizado neste trabalho, atualmente é conhecido como um dos mais sensíveis na área da biologia molecular. Todavia, segundo Gonzales-Moles et al. (2002) a PCR não discrimina a origem do DNA viral amplificado (células neoplásicas, linfócitos, saliva); corroborando com a escolha de Yildirim et al. (2011) pela imunohistoquímica. Alguns autores ainda afirmam que a técnica da imunohistoquímica de LMP-1 é interessante pois, consegue, diferentemente da PCR, identificar a origem do DNA. Além do que essa técnica não possui o inconveniente de aumentar as possibilidades de amplificação do DNA do

vírus presente na saliva, quando analisa-se amostras obtidas de esfregaços bucais. Entretanto, quando Cruz et al. (2000) utilizaram diferentes métodos (PCR, hibridização in situ, e imunoistoquímica) concluíram não existir evidências de que o EBV desenvolve papel na carcinogênese, pois, segundo os autores, a presença do EBV nas amostras de CEC detectadas pela PCR reflete somente a presença do vírus na saliva.

Este estudo entretanto não obteve nível de significância de acordo com o teste estatístico do Qui Quadrado de ($p < 0,05$) na associação entre as variáveis citobrush e saliva total de pacientes com leucoplasia oral, com a presença do vírus EBV, validando o estudo de Kis et al. (2009) que não encontrou diferenças significativas na prevalência de EBV em pacientes com leucoplasia oral.

Considerando que a taxa de detecção do EBV varia de acordo com a técnica de coleta de material e a fonte do mesmo, associada a poucos trabalhos sobre a infecção da leucoplasia oral pelo EBV, faz-se necessária à realização de novos estudos para ajudar a esclarecer as dúvidas ainda presentes a respeito desse tema.

6 CONCLUSÃO

Na execução deste trabalho conseguimos realizar uma alta detecção do DNA de EBV mediante utilização da n-PCR, nos permitindo concluir que tais fontes podem ser consideradas viáveis para a detecção do vírus. No entanto, apesar da alta taxa de detecção do vírus, não foi encontrada significância estatística de tais dados que nos permitissem validar as fontes de materiais utilizadas.

REFERÊNCIAS

- Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol*. 2011;16(1):5–14.
- Ammatuna P, Capone F, Giambelluca D, Pizzo I, D'Alia G, Margiotta V. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and antigens in oral mucosa of renal transplant patients without clinical evidence of oral hairy leukoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med*. 1998;27:420-7.
- Bagan JV, Scully C. Recent advances in oral oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol*. 2008;44:103-8.
- Baldan RCF. Correlação da candidose com a atividade proliferativa epitelial em leucoplasias da mucosa jugal [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
- Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Palmieri A, Stabellini G, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol*. 2005;41:365-74.
- Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Cianfriglia C, Marandino F, Perrone Donnorso R, Vocaturo A. Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006;25(1):21-8.
- Clemens MJ. Epstein-Barr virus: inhibition of apoptosis as a mechanism of cell transformation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:164-9.
- Cruz I, Brule AV, Steenbergen R, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa: a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol*. 1997;33:182-8.
- Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, et al. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer*. 2000;86(3):356-61.

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2004;40:158-63.

Dolcetti R, Masucci MG. Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol.* 2003;196(2):207-18.

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;30:987-92.

González-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112(3):482-7.

Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a tropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol.* 2002;55:414-23.

Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis.* 2007;195:474-82.

Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis.* 2007;195:474-82.

Khan G, Philip PS, Al Ashari M, Houcinat Y, Daoud S. Localization of Epstein-Barr virus to infiltrating lymphocytes in breast carcinomas and not malignant cells. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(1):466-70.

Kis A, Fehér E, Gáll T, Tar I, Boda R, Tóth ED, et al. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci.* 2009;117:536-40.

Kurokawa H, Yamashida Y, Takeda S, Tomoyose T, Funaki K, Takano H, et al. Relationship between epithelial dysplasia and the development of squamous cell carcinoma in oral leukoplakia. *Asian J Oral Maxillofac Surg.* 2002;14:197-201.

Lapthanasupkul P, Poomsawat S, Punyasingh J. A clinicopathologic study of oral leukoplakia and erythroplakia in a Thai population. *Quintessence Int.* 2007;38(8):e448-55.

Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin SM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1702-10.

Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer.* 2010;10:685.

Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based genechip array. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(2):153-8.

Maeda T, Hiranuma H, Matsumura S, Furukawa S, Fuchihata H. Epstein-Barr virus infection and response to radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett.* 1998;125:25-30.

Mao EJ, Smith CJ. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:12-7.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:774-81.

Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL, Roteli-Martins C, di Loreto C, Maeda MY, et al. Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis.* 2005;9(4):219-24.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd ed. London: Springer Verlag; 1997.

Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notanik K, Totsuka Y, Shinodoh M, et al. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30:49-53.

Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2002;93:586-92.

Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res*. 2005;40(2):187-91.

Shah KM, Young LS. Epstein–Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(11):982-8.

Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr Virus with oral cancers. *Hum Pathol*. 2002;33:608-14.

Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leucoplakia and malignant transformation: a follow up study. *Cancer*. 1984;33:363-8.

Suarez P, Batsakis JG, el-Naggar AK. Leucoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? – A review. *Adv Anat Pathol*. 1998;5:137-55.

Subdo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer*. 2005;115:339-45.

Vieira RR, Ferreira LL, Biasoli ER, Bernabé DG, Nunes CM, Miyahara GI. Detection of Epstein–Barr virus in different sources of materials from patients with oral lichen planus: a case–control study. *J Clin Pathol [periódico online]* 2015 [citado 25 jun 2016]. Disponível em: URL: <http://jcp.bmj.com/content/early/2015/10/14/jclinpath-2015-203325>

Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD, Adler-Storthz K. Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J Infect Dis.* 2001;184(12):1499-507.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Wall I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-80.

Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral cancer. *J Pathol.* 2000;190:407-9.

World Health Organization. Collaboration Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46(4):518-39.

Yang SW, Wu CJ, Lee YS, Chen TA, Tsai CN. Postoperative recurrence as an associated factor of malignant transformation of oral dysplastic leukoplakia. *J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2010;72(5):280-90.

Yang SW, Wu CJ, Lee YS, Chen TA, Tsai CN. Postoperative recurrence as an associated factor of malignant transformation of oral dysplastic leukoplakia. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2010;72(5):280-90.

Yildirim B, Sengüven B, Demir C. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papillomaviruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16:170-4.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aceitação do Comitê de Ética



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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Detecção 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