

CARLOS EDUARDO XAVIER DOS SANTOS RIBEIRO DA SILVA

**PREVALÊNCIA DO GENOMA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO
CARCINOMA ESPINO-CELULAR DA LÍNGUA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2006

CARLOS EDUARDO XAVIER DOS SANTOS RIBEIRO DA SILVA

**PREVALÊNCIA DO GENOMA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO
CARCINOMA ESPINO-CELULAR DA LÍNGUA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luc Louis Maurice Weckx

Co-orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

SÃO PAULO

2006

Silva, Carlos Eduardo Xavier dos Santos Ribeiro da
Prevalência do genoma do papilomavirus humano no
carcinoma espino-celular da língua. / Carlos Eduardo Xavier dos
Santos Ribeiro da Silva. – São Paulo, 2006.

xiii, 51f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Título em inglês: Prevalence of human papillomavirus genoma in the squamous cell carcinoma of the tongue.

1. Papillomavirus. 2. Neoplasias bucais. 3. Neoplasias de cabeça e pescoço. 4. Vírus oncogênicos. 5. Reação em cadeia da polimerase.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OTORRINOLARINGOLOGIA E
CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

COORDENADOR: Prof. Dr. Paulo Augusto de Lima Pontes

Dedicatória

A minha esposa, Márcia e a minha filha Thaís, mulheres da minha vida, agradeço sinceramente a compreensão e paciência de vocês em meus muitos momentos de ausência e pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos meus pais Ataliba e Maria Regina, pelas orientações e ensinamentos de vida e pela eterna dedicação e renúncia para minha formação pessoal e profissional. Estendo meus agradecimentos e carinho aos meus irmãos e amigos de todas as horas, Guto e Serginho.

Aos pacientes portadores de câncer bucal que, através de suas doenças, contribuíram para melhor conhecimento e combate desta cruel enfermidade.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luc Louis Maurice Weckx**, pelo grandioso aprendizado e pelas inúmeras oportunidades oferecidas nestes anos de convívio. Meus sinceros agradecimentos. Espero poder continuar contando com vossa confiança e amizade.

Ao **Prof. Dr. Artur Cerri**, por ter aberto a primeira porta através da qual iniciei na carreira docente, e estar permanentemente ao meu lado criticando, orientando e estimulando meu desenvolvimento. A você meu amigo, serei eternamente grato.

Ao **Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva**, pelas orientações e sugestões; e a **Naiara Souza**, pelo apoio operacional no Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP.

Ao **Prof. Francisco Octávio Teixeira Pacca**, meu amigo, agradeço a ajuda, o companheirismo e a paciência compartilhados nesses anos todos de convivência.

Aos meus colegas da Pós-graduação em Ciências da UNIFESP: **Ricardo Jahn, João Santos Junior, Carlos Eduardo Settani, Marcelo Viola, Emne Gumieiro, Roberto Moreno, Ronaldo Leite, Silvia Bakor, Silviene Novikoff, Silvia Regina Pereira, Thereza Ladalardo, Julio Motta, Alessandra Mazzoni, Luiz Aidar, Rosângela Florez, Laurindo Sassi e Mario Cappellette** em especial, pela ajuda em meu ingresso no Doutorado.

Aos meus colegas do Ambulatório de Estomatologia da UNIFESP: **Isaac Blachman, Marilda Abreu, Dalva Pimentel**, e em especial à **Profa. Dra. Cleonice Hirata**, pelos ensinamentos e pela ajuda na coleta do material deste trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Estomatologia da UNISA: **Prof. Dr. Artur Cerri, Prof. Dr. Paulo Bordini, Prof. Henrique Prats, Prof. Francisco Pacca, Profa. Daniela Marti e Cd. Rodrigo Cerri**, pelo carinho e pela colaboração na coleta do material para o trabalho.

Aos Professores e funcionários das Disciplinas de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP, pelo apoio e confiança depositados, em especial ao **Prof. Dr. Paulo Augusto de Lima Pontes**.

A **Gleice de Souza Conceição**, da Disciplina de Clínica Médica da UNIFESP, pela análise estatística do trabalho.

Simbolizando o agradecimento a toda minha família, gostaria de lembrar minha querida e inesquecível **tia Rita**, que tão precocemente nos deixou.

Finalmente, agradeço a **Deus**, pela oportunidade de poder realizar este sonho.

ÍNDICE

Resumo.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3. MÉTODO.....	17
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	38
Anexos	
Abstract	
Bibliografia consultada	

Resumo

Os papilomavírus humanos (HPVs) oncogênicos são importantes agentes na gênese do câncer ginecológico e têm sido implicados também nos cânceres da boca. Com objetivo de avaliar a relação entre o HPV e o carcinoma espino-celular (CEC) da língua, foram selecionados 50 pacientes do sexo masculino, da raça branca, fumantes e com diagnóstico histológico de CEC, e um grupo controle composto por 10 pacientes sem evidências clínicas de lesão na língua. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi utilizada para detectar a presença do genoma HPV em amostras de tecido fresco, provenientes CEC da margem da língua. Trinta e sete pacientes (74%) apresentaram resultado positivo de PCR para papilomavírus oncogênicos, sendo que no grupo controle apenas uma amostra (10%) foi positiva para os papilomavírus não-oncogênicos. Pôde-se concluir através de análise estatística deste trabalho que o paciente portador de papilomavírus oncogênico na cavidade bucal possui 25,6 vezes mais chance de desenvolver o CEC da língua devendo, portanto ser acompanhado de forma sistemática, através de exames clínico e complementar.

1. INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus do gênero *Papillomavirus*, pertencente à família *Papovaviridae*, com mais de 120 subtipos identificados até o momento, epiteliotrópicos e altamente espécie-específicos, não havendo até então nenhum caso de papilomavírus de uma espécie causando infecção em outra (Howley, 1996).

O vírus HPV é composto por um genoma de 8000 pares de bases de DNA de cadeia de dupla fita formando um complexo semelhante a um cromossomo, envolvido por um capsídeo externo protéico sem ser envelopado de 55 nanômetros (nm) de tamanho.

Esse capsídeo, por sua vez, é formado por 72 subunidades (capsômeros), com arranjo icosaédrico, motivo pelo qual quando examinado à microscopia eletrônica, apresenta formato esférico.

A estrutura viral é constituída por dois tipos de proteínas: L1 (também chamada de proteína maior), que é gênero-específica, sendo sua presença correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos, servindo como medidor indireto de infectividade e L2 ou proteína menor, sendo altamente tipo-específica (relacionada com cada sub-tipo do vírus).

O genoma do vírus contém dois segmentos principais, sendo cada um constituído por uma série de "regiões" ou ORFs (*opening reading frames*) que codificam as proteínas virais. O segmento E (*early*) que representa 45% do genoma, é constituído por oito ORFs e codifica proteínas relacionadas com a replicação e controle do genoma. O segmento L (*late*) que representa 40% do genoma é responsável por codificar as proteínas estruturais do capsídeo do vírus. Entre os segmentos L e E existe um outro segmento que representa 15% do genoma, que contém elementos regulatórios.

O sítio de abertura da molécula circular do DNA do vírus é específico, ou seja, sempre se abre no mesmo local, entre E1 e E2. E2 é responsável por reprimir a transcrição dos genes virais E6 e E7. Uma vez que E2 é inativado pela abertura da molécula virótica, há uma super expressão dos genes E6 e E7.

O potencial oncogênico do vírus HPV é relacionado aos produtos destes genes, que interagem e inativam proteínas celulares derivadas dos genes supressores de tumores p53 e p105-RB, além de promover a degradação destes genes, bloqueando sua função. A oncogenicidade, entre outras condições, vai depender diretamente do grau de afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores e as proteínas virais derivadas dos genes E6 e E7 (Syrjanen et al, 1983).

Assim sendo, os produtos dos genes E6 e E7 dos HPV de “alto risco” apresentam grande afinidade com as proteínas derivadas de p53 e p105-RB, enquanto os produtos derivados dos genes dos vírus de “baixo risco” possuem baixa afinidade com tais proteínas. O resultado da penetração do vírus é a imortalização das células em que o HPV foi integrado. Estas células exibem morfologicamente figuras de mitose anormais, pleomorfismo nuclear, valores de DNA aneuplóides, consistentes com número cromossomal anormal e alteração arquitetural dos cromossomos (Syrjanen et al, 1983).

Porém, estas células só passam a ser geradoras de tumor quando os genes transformantes E6 e E7 são expostos a oncogenes celulares ativados. Contudo, o HPV não atua isoladamente na oncogênese; outros fatores tais como estado imunológico do hospedeiro, carência nutricional, uso de fumo e álcool atuam em conjunto, favorecendo e potencializando a instalação do tumor.

Ocorre que a associação destes fatores com os sub-tipos de HPV oncogênicos são extremamente importantes na gênese dos tumores malignos, uma vez que o fumo e o álcool atuam como fatores indutores e o papilomavírus age na fase de promoção tumoral.

Alguns sub-tipos do HPV são responsáveis por verrugas vulgares, condilomas anogenitais, papilomas da cavidade bucal e nasofaringe, e outros são associados a neoplasias malignas.

A infecção pelo HPV é a Doença Sexualmente Transmissível (DST) mais prevalente na população adulta, sendo inegável sua íntima relação com o aparecimento das neoplasias cervicais, pois segundo alguns autores pode estar presente em até 100% das pacientes portadores de câncer de colo de útero (zur Hausen, 2000).

A principal via de transmissão do HPV é a sexual, tanto em homens quanto em mulheres, mas existe ainda a possibilidade menos comum de transmissão por outras vias como a sanguínea, pelo canal do parto, pelo beijo e até por objetos contaminados ou fômites (Bergeron et al, 1990).

Na década de 90 foram realizados inúmeros estudos ratificando que a infecção por determinados sub-tipos de HPV é um evento precursor do câncer ginecológico (Bosch et al, 1995)

Os diferentes tipos de HPV são divididos em dois grupos dependendo de seu potencial oncogênico. Os HPVs considerados não oncogênicos são os sub-tipos 6, 11, 42 e 54, normalmente presentes nas lesões verrucosas, papilomas e condilomas. Enquanto que os oncogênicos são os sub-tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 66, 68, estes freqüentemente presentes nos casos de neoplasias malignas (Villa, 1997).

Lesões papilomatosas e/ou verrucosas eram descritas desde à Grécia Antiga associadas a doenças venéreas, pois eram extremamente comuns em pessoas que apresentavam comportamento sexual considerado promíscuo para a época.

Papanicolaou descreveu em 1933 as primeiras observações sobre alterações verrucosas da mucosa vaginal, apesar de ainda não ser identificado o agente causador (zur Hausen, 1977).

Em publicação de 1977, zur Hausen formulou a hipótese de que a etiologia dos cânceres do colo de útero tinha importante participação do papilomavírus.

A partir de então houve um crescimento expressivo do interesse pelo estudo do papilomavírus e sua relação com as neoplasias malignas, particularmente na região genital feminina.

Segundo Pereyra et al (1994), a presença dos HPVs oncogênicos 16 e 18 tem sido descrita em até 95% dos casos de lesões malignas da região genital feminina.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima a prevalência do HPV nos casos de câncer de colo uterino em 94%, tendo ainda importante papel no desenvolvimento de displasias epiteliais.

A simples presença do HPV oncogênico pode aumentar o potencial relativo para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical em até 116 vezes (Rozendal et al, 1996). Entretanto o DNA dos HPVs não oncogênicos raramente são encontrados em lesões malignas.

Estima-se que de 10 a 40% da população sexualmente ativa são infectados por um ou mais sub-tipos de HPV, sendo, que a maior parte destas lesões é transitória, ou seja, o sistema imunológico, produz anticorpos capazes de inibir a ação do vírus (Villa, 1997).

Os estados físicos do DNA do vírus são diferentes nas lesões benignas e malignas. Nas primeiras, ele está presente não integrado ao genoma da célula hospedeira e em múltiplas cópias sendo que nas lesões malignas ele integra-se ao genoma da célula hospedeira formando uma ligação estável e perdendo a capacidade de se replicar de maneira autônoma, caracterizando a chamada ligação epissomal.

Nas lesões malignas o sítio de ligação nos cromossomos não segue qualquer padrão, porém este sítio é constante em todas as células de um mesmo tumor e parece ter alguma preferência por locais frágeis ou próximos a oncogenes celulares.

O HPV atinge o núcleo das células basais através de microlacerações no epitélio, sendo que os primeiros sinais de transcrição do genoma virótico aparecem cerca de quatro semanas após a infecção.

O período de incubação varia de 3 a 18 meses e a persistência das lesões pode ser mantida por semanas, meses ou até mesmo anos. Esta variação parece estar mais relacionada com particularidades do hospedeiro que do vírus, a exemplo do que é observado em pacientes com imuno-deficiências que parecem ser portadores de lesões mais exuberantes e persistentes.

Na cavidade bucal o papilomavírus está associado principalmente ao papiloma (tumor benigno de aspecto de “couve-flor”) e mais raramente a presença de verrugas vulgares e condiloma acuminado.

A primeira referência da possibilidade de envolvimento do papilomavírus com as neoplasias bucais foi feita por Syrjanen et al (1983), através da observação de alterações histológicas compatíveis com infecção viral associada ao tumor.

O câncer de boca é uma importante causa de mortalidade e morbidade no Brasil. Segundo dados do INCA a estimativa da incidência de casos novos para 2005, o coloca como 8º tipo mais freqüente no sexo masculino e o 9º no sexo feminino, com 9.985 e 3.895 casos respectivamente. Além disso, no Brasil infelizmente os casos são diagnosticados tardiamente, quando o prognóstico é pior e a chance de cura torna-se mais difícil. Estima-se que cerca de 75% dos casos de câncer bucal sejam diagnosticados em fases superiores a T2 (Classificação TNM – Tumores maiores que 4 cm de diâmetro).

O tipo de câncer mais prevalente na cavidade bucal é o carcinoma espino-celular (CEC) representando aproximadamente 95% de todas as neoplasias malignas do complexo maxilo-mandibular.

Os fatores de risco para o câncer bucal são segundo o INCA o fumo, consumo excessivo de álcool, exposição à radiação solar (para neoplasias de lábio inferior) e trauma crônico.

O fumo é considerado carcinógeno completo por ser um agente indutor e simultaneamente promotor do câncer pela atuação de 4720 substâncias químicas produzidas pela combustão do fumo.

O álcool por sua vez aumenta a permeabilidade celular tornando as células mais susceptíveis aos agentes carcinogênicos do fumo estimando-se numa chance 141 vezes maior a possibilidade de desenvolver neoplasia bucal as pessoas etilistas crônicas que também fumam.

Alguns autores têm associado à presença de HPV, particularmente os subtipos 16 e 18 como fatores contribuintes para o aparecimento do Carcinoma Espino-Celular (CEC) da cavidade bucal (Minetta et al, 1998; Gillison et al, 2000).

A prevalência do HPV no câncer bucal varia de 0% a 100% nos trabalhos da literatura, principalmente por variações no tamanho da amostra, população estudada e sensibilidade das técnicas empregadas (Chatterjee et al, 1997).

O diagnóstico da presença do HPV nos tecidos pode ser feito de diversas formas: Captura Híbrida, Hibridização “*in situ*” e Reação em Cadeira pela Polimerase (PCR), sendo este último método o mais indicado, pois além de ser o mais sensível, é capaz de identificar o sub-tipo do vírus e conseqüentemente seu risco, além de ter a capacidade de amplificar quantidades reduzidas de DNA viral. Bastam apenas 10 cópias do vírus para que o processo de PCR possa amplificá-las e permitir sua detecção.

O tratamento preferencial das lesões causadas pelo HPV é sua remoção cirúrgica, que pode ser feita de inúmeras formas, como por exemplo a abrasão local, agentes cáusticos, químicos, elétricos, crioterapia e cirurgia a laser.

O tratamento medicamentoso para o HPV ainda requer maiores estudos, mas o uso do interferon parece promissor. (Zhang et al, 2004)

Existem dois grandes estudos em andamento na tentativa de se produzir uma vacina capaz de impedir a infecção pelo HPV na região genital feminina. Enquanto um desses grupos concentra-se apenas nos sub-tipos 16 e 18, o outro acrescenta também proteção contra o 6 e o 11, que são causadores das verrugas genitais. Os primeiros resultados desses estudos mostram-se bastante animadores, e apesar do foco da vacina ser o câncer ginecológico, por produzir imunidade ao vírus, esta vai contribuir concomitantemente para a diminuição do câncer de boca.

1.1 Objetivo

O presente estudo tem como objetivo avaliar a presença do genoma papilomavírus humano (HPV) em amostras de tecido fresco de carcinoma espino-celular da língua, por meio da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), e comparar esses resultados com o grupo controle.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Apesar da literatura ser extensa quando aborda a relação entre o Papilomavírus Humano (HPV) e a iniciação e progressão das neoplasias bucais, seus resultados são muitas vezes e conflitantes e antagônicos.

Tal discrepância pode ser atribuída principalmente à variedade de metodologias aplicadas nas pesquisas e na diversidade dos grupos epidemiológicos examinados, como pode ser observado na figura 1.

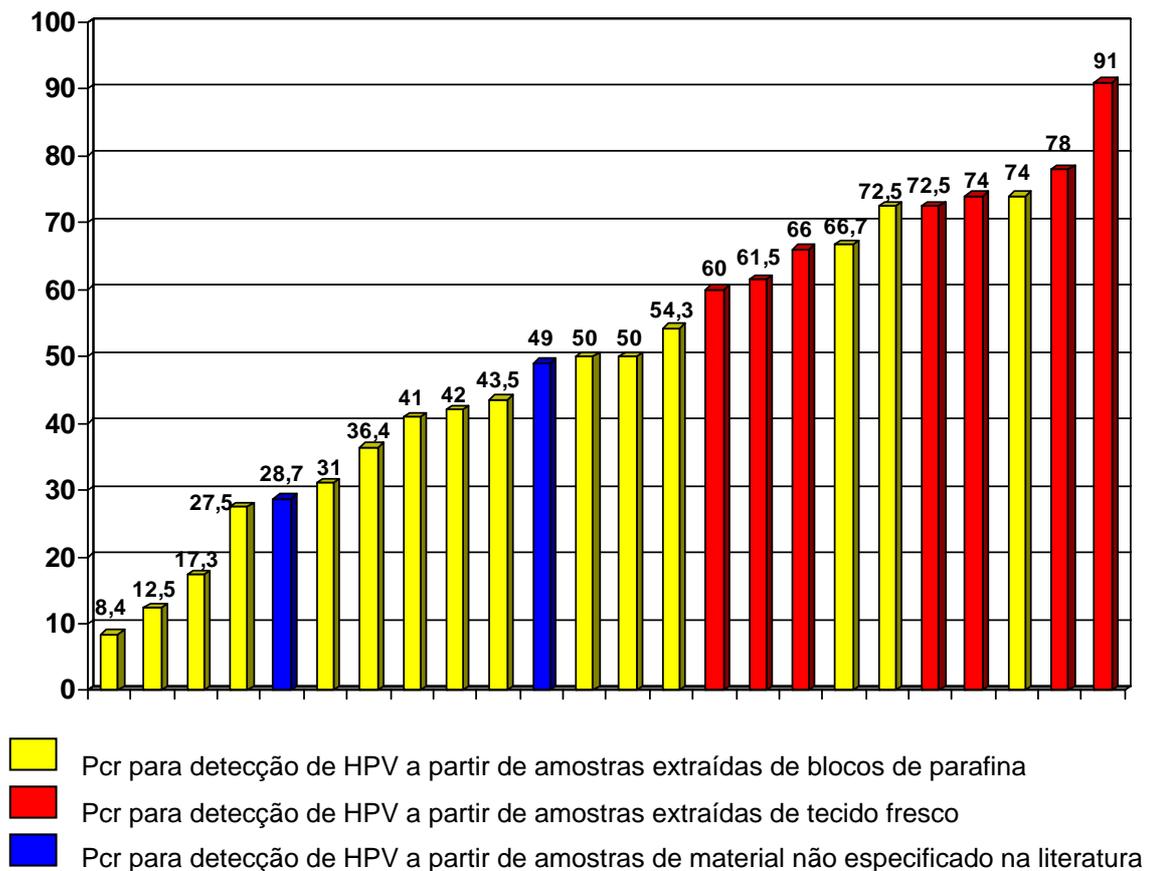


Figura 1 - Discrepância entre a prevalência do HPV no CEC bucal na literatura consultada

Por esse motivo, optamos por colocar os dados num quadro a fim de facilitar a compreensão do leitor, contemplando apenas aqueles trabalhos que possuem metodologia semelhante ao nosso estudo (Quadro 1). Vale ressaltar que selecionamos apenas trabalhos que utilizaram o PCR como método de detecção do DNA viral.

Quadro 1 - HPV e Câncer bucal

Título do trabalho	Revista	Autores	Pacientes normais	CEC ORAL	Tipo de Material	Tipos de HPV
Detection of human papillomavirus (hpv) dna in oral squamous cell carcinomas by situ hybridization and polymerase chain reaction.	Arch dermatol res. 1990;282(8):493-7.	Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, Karja S, Syrjanen K.	40 pacientes Hpv em 0% Tecido adjacente	40 pacientes Hpv em 27,5%	Bloco de parafina	
P 53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity and oral cancer	Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod 2000 90 (3) 334-9	Summersgill, K F Smith M, Kirchner, H. L	333 pacientes Hpv em 11,1%	202 pacientes Hpv em 28,7%	Não disponível	16/18/31/33/ 58
Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a mexican population	Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod. 2005 mar;99(3):311-5	Ibieta B R, Lizano M, Frasmendivil M, Barrera J L, Carrillo A, Mohar A		51 pacientes Hpv em 42%	Bloco de parafina	16 (66,6%)
Human papillomavirus dna in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa	Acta virol. 2003;47(1):11-6	Kansky A A, Poljak M, Seme K, Kocjan B J, Gale N, Luzar B, Golouh R	62 pacientes 6.6%.Obtido por raspagem	62 pacientes Hpv em 8,4%	Bloco de parafina	16, 33, 58 (cec) 11, 16, 31, 68(nl)
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	Miller, C S, Johnstone B.	Hpv em 10%	Cec in situ 26,2% Cec verrucoso 29,5 Cec 46,5%	Não disponível	
Human papillomavirus infection and p 53 alteration in oral squamous cell carcinoma	Chin dent res 2000 nov, 3(3), 44-9	Cao J, Zhang Z Y, Zhang Y X	20 pacientes Hpv em 0%	40 pacientes Hpv em 72,5%	Tecido fresco	16/18
"high risk" hpv types are frequently detected in potentially malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa	Mod pathol13(6) 644-53 2000 jun	Bouda M, Gorgoulis V G, Kastrinakis N	16 pacientes Hpv em 0%	53 pacientes Hpv em 91%	Tecido fresco	16/18/33/6 Sendo 71% 16
Human papillomavirus dna detection in oral lesions in the greek population	Anticancer res. 1999 mar apr;19(2b):1391-5.	Aggelopoulou E P, Skarlos D, Papadimitriou C, Kittas C, Troungos C.		81 pacientes Hpv em 49%	Blocos de parafina	
Human papillomavirus type 16 and 18 dna in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa	Int j oral maxillofac surg. 2004 jan;33(1):71-4	Zhang Z Y, Sdek P, Cao J, Chen W T	40 pacientes Hpv em 55% Tecido adjacente	73 pacientes Hpv em 74%	Bloco de parafina	16/18
High risk human papillomavirus in oral squamous carcinom: evidence of risk factor in venezuelan rural population	J oral pathol med 2001 jul 30 (6) 355-61	Premoli-de peroco, G. Ramirez j L		50 mulheres Hpv em 60%	Tecido fresco	6/11/16/18
Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters.	Anticancer res. 2000 mar-apr; 20(2b):1301-5.	Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante M L		38 pacientes Hpv em 36,4%	Bloco de parafina	

Continua...

... continuação

Título do trabalho	Revista	Autores	Pacientes normais	CEC ORAL	Tipo de Material	Tipos de HPV
Human papillomaviruses in 91 oral cancers from indian betel quid chewers -high Prevalence and multiplicity of infections	Int j cancer. 1995 may 16;61 (4): 450-4.	Balaram P, Nalinakumari K R, Abraham E, Balan A, Hareendran N K, Bernard H U, Chan S Y.		91 pacientes Hpv em 74%	Tecido fresco	
Human papillomavirus in oral premalignant lesions	Eur j cancer b oral oncol1996 (32) 264-70	Nielsen H, Norrild B, Vedofte P	20 pacientes Hpv em 0%	Hpv em 50% Cec "in situ" (20 pacientes) Hpv em 72,5%" (40 pacientes)	Tecido fresco	6/11/16/18/31/33
Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a venezuelan population.	Oral dis. 2004 may;10(3):163-6.	Correnti M, Rivera H, Cavazza ME.		16 pacientes Hpv em 50%	Bloco de parafina	
Age-dependence of human papillomavirus dna presence in oral squamous cell carcinomas	Eur j cancer b oral oncol. 1996 jan;32b(1):55-62	Cruz IB, Snijders PI, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I	12 pacientes Hpv em 0% Pós exodontia	35 pacientes Hpv em 54.3%	Tecido fresco	16/18
Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant. Lesions of the oral cavity in U K. subjects: a novel method of detection	Oral oncol. 1998 may;34(3):191-7	Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M		28 pacientes Hpv em 50%	Bloco de parafina	16
Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas	Oral oncol. 2002 sep;38(6):591-6	Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama Y		53 pacientes Hpv em 66%	Bloco de parafina	38
Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community	Int J cancer. 2005 mar 1;113 (6):946-50	Koppikar P, Devilliers E M, Mulherkar R	102 pacientes Hpv em 5% Obtido por raspagem	102 pacientes Hpv em 31%	Bloco de parafina	16/18
Detection of hpv dna in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hibridization	Oral surg oral med oral pathol. 1994 may;77(5):480-6	Miller C Z, Zeuss M S, White DK		30 pacientes Hpv em 66,7	Bloco de parafina	16/18
Identification and typing of human papillomavirus (hpv) in squamous cell. Carcinoma of the oral cavity and oropharynx	J laryngol otol. 2000 jan;114 (1): 41-6	Niv A, Sion-varidi N, Gatot A, Nash M, Fliss D M		23 pacientes Hpv em 17,3%	Bloco de parafina	16
Human papillomavirus dna in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa	J oral pathol med. 1994 may;23(5):220-5	Ostwald C, mMuller P, Barten M, Rutsatz kK, Sonnenburg M, Milde-langosch K, Loning T	97 pacientes Hpv em 1% Obtido por raspagem	26 pacientes Hpv em 61,5%	Tecido fresco	16/18/58
Human papilloma viruses in oral lesions	Anticancer res. 2000 mar-apr;20 (2b) :1183-8	Sand I, Jalouli J, Larsson P A, Hrsch J M	12 pacientes Hpv em 0% (tecido fresco)	24 pacientes Hpv em 12,5%	Bloco de parafina	16/18/6
Detection of human papillomavirus dna in oral verrucous carcinoma by polymerase chain reaction	Mod pathol. 1993 nov;6(6):669-72	Shroyer K R, Greer R O, Fankhouser C A, Mcguirt W F, Marshall R		17 pacientes Hpv em 41%	Bloco de parafina	16/18/6
Analysis of human papillomavirus dna in oral squamous cell carcinomas	J oral pathol med. 1993 mar;22(3):101-8	Woods K V, Shillitoe E J, Spitz M R, Schantz S P, Adler-storthz K	9 pacientes Hpv em 67% Tecido adjacente	18 pacientes Hpv em 78%	Tecido fresco	16/18

Chang et al (1990) avaliaram a presença do HPV em tecidos provenientes de carcinomas espino-celulares da cavidade bucal parafinados de 40 pacientes, onde encontraram a presença do DNA viral em 27,5%. Pesquisaram ainda o tecido normal adjacente ao tumor e não encontraram sinais do DNA viral.

Shroyer et al (1993) pesquisando a presença de HPV em blocos parafinados de CEC bucal detectaram a presença de DNA viral em 41% dos pacientes, com predominância dos sub-tipos 16, 18 e 6.

Woods et al (1993) avaliaram amostras de tecido fresco provenientes de CEC bucal de 18 pacientes, tendo encontrado o DNA viral em 78% dos casos. Avaliando o tecido adjacente a CEC bucal em nove pacientes, encontraram o vírus em 67% dos casos.

Brandwein et al (1994) analisaram através de PCR tecidos fixados em formol e parafinados provenientes de 64 pacientes portadores de câncer de boca e detectaram o DNA do vírus HPV em 16 pacientes, totalizando 25% dos casos.

Miller et al (1994) pesquisaram o tecido parafinado de CEC bucal de 30 pacientes e detectaram o HPV em 66,7% das amostras.

Ostwald et al (1994), através da pesquisa de tecido fresco de 26 pacientes com CEC bucal, detectaram a presença de HPV sub-tipos 16, 18 e 58 em 61,5% dos casos. Utilizaram como grupo controle 97 pacientes do mesmo grupo epidemiológico e através de raspagem detectaram o vírus em 1% das amostras.

Balaram et al (1995) pesquisaram a presença de DNA do vírus HPV em tecido fresco proveniente de 91 pacientes portadores de CEC bucal, encontrando o mesmo em 74% dos casos.

Nielsen et al (1996) avaliaram através do PCR a mucosa de 20 pacientes normais e não detectaram a presença do HPV em nenhum caso. Examinaram ainda 20 pacientes com leucoplasia onde a prevalência de HPV chegou a 44% e 20 pacientes com CEC *“in situ”* que apresentaram o papilomavírus humano em 50% das amostras analisadas.

Porém ao analisarem a mucosa bucal de 40 pacientes portadores de CEC, observaram a presença de HPV em 72,5% dos casos, em especial dos sub-tipos 16 e 18.

Cruz et al (1996) através de amostras de tecido fresco de CEC bucal determinaram a presença de HPV em 54,3% das amostras analisadas. Como grupo controle utilizaram o tecido proveniente de exodontia de 12 pacientes sem evidências clínicas de CEC e do mesmo grupo epidemiológico dos demais, não encontrando presença do HPV em nenhuma amostra.

Elamin et al (1998) através do estudo de 28 blocos de parafina de pacientes com CEC bucal, pelo método de PCR determinaram a presença de HPV em 50% dos casos com predominância do sub-tipo 16.

Aggelopoulou et al (1999) pesquisaram blocos de parafina de CEC bucal de 81 pacientes, detectando a presença de HPV em 49% dos casos.

Badaracco et al (2000) determinaram a presença de HPV em 36,4% dos pacientes portadores de CEC bucal, pesquisando amostras parafinadas de 38 pacientes.

Bouda et al (2000) examinaram 69 pacientes, sendo 16 sem a presença de lesões bucais e os 53 restantes com as seguintes alterações: 29 casos de hiperplasia, cinco casos de displasia e 19 casos de carcinoma espino-celular. Todas as amostras foram submetidas ao método de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), cujos resultados demonstraram que nenhum dos casos de mucosa bucal normal apresentava HPV e que 91% dos casos com lesões possuía pelo menos um sub-tipo de HPV considerado de alto risco como o 16/18 ou 33.

Summersgill et al (2000) avaliaram 333 pacientes normais e encontraram uma prevalência de HPV de 11,1% na mucosa bucal, enquanto que após o exame de 202 pacientes com CEC, este percentual chegou a 28,7%. Os sub-tipos encontrados foram o 16 / 18 / 31 / 33 e 58. Todos os diagnósticos se valeram do exame de PCR. Para os pacientes sem lesão, o material foi colhido através de método de Papanicolaou (raspagem da mucosa) e nos casos de câncer foi utilizado material previamente fixado com formol e envolvido por parafina.

Cao et al (2000) utilizando-se do exame PCR examinaram a mucosa de 20 pacientes sem nenhuma lesão bucal, onde não foi detectada a presença do HPV em nenhum dos casos. Porém ao analisarem a mucosa bucal de 40 pacientes portadores de CEC, observaram a presença de HPV em 72,5% dos casos, em especial dos sub-tipos 16 e 18.

Sand et al (2000) através da análise das amostras de CEC bucal parafinadas de 24 pacientes detectaram o HPV em 12,5% dos casos. Através da análise de tecido fresco de 12 pacientes obtido por raspagem a prevalência de HPV foi de 0%.

Miller, Johnstone (2001) fizeram uma análise retrospectiva de 4680 amostras de tecido, onde obtiveram a ocorrência de HPV em 10% dos casos de mucosa bucal normal, 22,2% nos casos de Leucoplasia, 26,2% nos Carcinomas intra-epiteliais (CEC "*in situ*"), 29,5% nos Carcinomas Verrucosos e finalmente 46,5% nos casos de carcinoma espino-celular. Eles estimaram a probabilidade de detecção do HPV em lesões cancerizáveis entre 2 a 3 vezes maior que na mucosa normal e para o CEC, esta possibilidade aumentaria para aproximadamente 4,7 vezes. Como conclusão de seu estudo, afirmaram que a presença de HPV, particularmente os sub-tipos chamados de "alto risco" como o 16 / 31 / 33 / 35 / 39 / 45 e 52 são fatores importantes a serem considerados na gênese do câncer bucal.

Jimenez et al (2001) avaliaram 60 pacientes sendo 20 sem a presença de lesões bucais e 40 com diferentes patologias. Todos os espécimes foram submetidos ao exame de PCR, onde obtiveram os seguintes resultados: A mucosa normal apresentou ocorrência de HPV em 10% dos pacientes, sendo os sub-tipos encontrados o 6 e o 16, enquanto que nas amostras dos pacientes com lesão, este percentual chegou a 55% dos casos, encontrando-se além destes sub-tipos o 13 e o 32.

Mork et al (2001) analisaram através de PCR tecidos fixados em formol e parafinados provenientes de 160 pacientes com câncer de boca e detectaram a presença de HPV oncogênico sub-tipo 16 em 14% das amostras.

Kojima et al (2002) estudaram os blocos de parafina de 53 pacientes portadores de CEC bucal e estes apresentaram uma prevalência de HPV sub-tipo 38 em 66% dos casos.

Kansky et al (2003) testaram a presença do HPV através do método de PCR em 62 pacientes portadores de CEC bucal, encontrando HPV em 8,4% dos casos e utilizaram como grupo controle 62 pacientes sem evidências clínicas de lesão na mucosa bucal, que tiveram seu material colhido através de raspagem. Nesse grupo foi localizada a presença de HPV em 6,6% dos pacientes, com predominância dos sub-tipos 6 e 11.

Herrero et al (2003) através de uma estudo multicêntrico realizado em 9 países onde foram analisados os espécimes provenientes de 1670 pacientes com câncer (Sendo 1415 casos de câncer bucal e 255 casos de câncer da orofaringe) obtiveram a detecção do DNA do HPV em 3,9% dos casos. Do total de pacientes recrutados, apenas 766 obtiveram resultados validos de PCR e foram portanto incluídos na análise estatística.

Zhang et al (2004) pesquisaram através de PCR os tecidos parafinados de 73 pacientes portadores de CEC bucal e detectaram a presença do DNA do HPV em 74% dos casos. Avaliaram ainda o tecido adjacente ao tumor em 40 pacientes encontrando o vírus em 55% das amostras.

Correnti et al (2004), pesquisaram o HPV de blocos de parafina de casos de CEC bucal em 16 pacientes, encontrando o DNA viral em 50% dos casos.

Ibieta et al (2005) avaliaram amostras de tecido de CEC bucal, oriundas de blocos de parafina encontrando o DNA viral em 42% dos casos, com predominância do sub tipo 16 do HPV (66,6% dos casos).

Koppikar, de Villiers e Mulherkar, pesquisaram em 2005 a presença de DNA do vírus HPV em 102 amostras de tecido de CEC bucal parafinadas, localizando o vírus em 31% dos casos com maior prevalência dos sub-tipos 16 e 18. Utilizaram como grupo controle 102 pacientes do mesmo grupo epidemiológico e através de raspagem detectaram o vírus em 5% das amostras.

3. MÉTODO

3.1 Casuística

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 60 amostras de tecido fresco, provenientes da margem da língua, sendo 50 de pacientes com carcinoma espino-celular (CEC) e 10 de pacientes sem evidências clínicas de doença denominados de grupo controle. Os pacientes participantes eram do sexo masculino, acima de 40 anos, da raça branca e fumantes.

3.1.1 Seleção dos pacientes

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia da Universidade de Santo Amaro – UNISA. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico estomatológico, composto por anamnese, exame físico extra-bucal e exame clínico intra-bucal, realizados pelo autor do presente trabalho, para maior coerência dos resultados.

3.1.2 Critérios de inclusão

Todos os pacientes selecionados para participar da pesquisa, deveriam obrigatoriamente tomar ciência dos propósitos do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) após cuidadosa leitura do mesmo. O trabalho de coleta do material somente foi iniciado após a aprovação pelos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa da UNIFESP em 28 de Junho de 2002, sob o número 0498/02 (Anexo 2) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA em 04 de Dezembro de 2002, sob o número 45-a/2002 (Anexo 3)

Para poder fazer parte da pesquisa os pacientes tinham de ser do sexo masculino, raça branca, com idade acima de 40 anos e fumantes.

Estes parâmetros foram utilizados por serem estatisticamente o grupo de maior incidência dos cânceres bucais segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2002). Foram considerados fumantes aqueles pacientes que declararam fumar há mais de 10 anos, no mínimo um maço (20 cigarros) por dia, por serem considerados de maior risco para o desenvolvimento de Câncer Bucal (INCA, 2002).

Para o grupo denominado CEC era necessária a presença de carcinoma espino-celular, com diagnóstico histológico, obtido por biópsia incisional em margem da língua. A região de margem da língua foi escolhida por ser a região anatômica de maior prevalência do carcinoma espino-celular intra-bucal e portanto a mais representativa em termos de relação do HPV e câncer.

Os pacientes foram agrupados em uma tabela (Anexo 4) a fim de que a análise estatística dos resultados fosse facilitada.

3.1.3 Critérios de exclusão

Foram definidos como critérios de exclusão deste estudo, a presença de doenças sistêmicas que pudessem predispor o paciente ao aparecimento de neoplasias malignas ou que facilitassem a instalação do vírus HPV, como por exemplo, história de outra neoplasia, transplantes de órgãos, Aids, imunodeficiências, etc.

Também foram excluídos aqueles pacientes que porventura apresentassem qualquer patologia da cavidade bucal, à exceção obviamente dos pacientes portadores de CEC de margem da língua. A exclusão de pacientes com outras lesões bucais está alicerçada na possibilidade da interferência do HPV em diversas patologias da boca.

Os pacientes excluídos da pesquisa tiveram seus tratamentos realizados normalmente nos ambulatórios, e aqueles com doenças sistêmicas foram encaminhados aos serviços pertinentes da UNIFESP ou UNISA, conforme o caso.

3.1.4 Rotina de atendimento

Na anamnese foram feitas perguntas sobre os antecedentes familiares, antecedentes pessoais, história médica e história da moléstia atual.

No exame físico extra-bucal foi avaliada a face e pescoço dos pacientes, bem como a palpação das cadeias linfonodais sub-mandibulares, sub-mentonianas, pré e pós auriculares e cervicais.

No exame intra-bucal, todas as estruturas foram inspecionadas e palpadas, a saber: lábios superior e inferior, mucosa labial, mucosa jugal, rebordo alveolar, palato duro e mole, dorso, ventre e margens laterais da língua e finalmente o assoalho da boca.

A ficha de exame clínico utilizada foi especialmente desenvolvida para este trabalho (Anexo 5).

3.1.5 Material utilizado para o exame clínico intra-bucal

- Luz Artificial dos refletores odontológicos
- Espátula de Madeira
- Gazes
- Espelho Clínico

3.1.6 Pacientes com suspeita clínica de CEC de Língua

Foram submetidos a bochecho pré-operatório com clorexidina a 0,12% como agente antisséptico durante um minuto, a fim de minimizar-se o risco de infecção pós-operatória.

A técnica anestésica utilizada foi a troncular visando o nervo lingual com Lidocaína 2% com vasoconstrictor (1,8 ml), a fim de se conseguir anestesia na região da hemi-língua desejada.

A opção pela anestesia troncular em detrimento da local, deveu-se ao fato de evitar-se o edema provocado pela injeção do anestésico na área a ser biopsiada. Foi realizada biópsia incisional da lesão, associando-se fragmento de tecido normal circunjacente. Da área da lesão foi removido pequeno fragmento de tecido utilizando-se para esse fim um *punch* número 5 (diâmetro aproximado de 5,0mm). O local foi suturado com fio absorvível categute 4-0, para evitar-se desta forma a necessidade de remoção da sutura.

Os pacientes foram orientados quanto a higiene local através de bochechos com clorexidina a 0,12%, 3 vezes ao dia, de não fazerem uso de alimentação quente nas primeiras 24 horas e uso de analgésico (paracetamol) caso houvesse sintomatologia dolorosa no pós-operatório. Receberam ainda cópia das orientações e do termo de consentimento onde poderiam obter a qualquer tempo contato com o autor para dirimir dúvidas e sanar quaisquer intercorrências.

3.1.7 Pacientes sem evidência clínica de lesão na língua – Grupo Controle

Para os pacientes que não apresentavam indícios clínicos de lesão, optou-se pela infiltração de pequeno botão anestésico (Lidocaína a 2% com vasoconstrictor) na margem da língua. A remoção de tecido foi realizada com punch número 2 (2,00 mm de diâmetro), que devido às suas diminutas dimensões não foram realizados procedimentos de sutura. As orientações pós-operatórias foram semelhantes para ambos os grupos.

3.1.8 Acondicionamento do material

O tecido removido com hipótese diagnóstica de CEC foi dividido em dois fragmentos, sendo um acondicionado em formol a 10% para realização de exame anátomo-patológico de confirmação e o outro num frasco eppendorf com soro fisiológico a 0,9% e congelado no Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP a 20°C negativos.

Da mesma forma, aqueles pacientes do Grupo Controle tiveram suas amostras colocadas em eppendorf com soro fisiológico a 0,9% e congeladas à 20°C negativos para posterior realização de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Os frascos foram numerados de 1 a 50 para o Grupo CEC e de 51 a 60 para o Grupo Controle.

3.1.9 Diagnóstico anátomo-patológico

Nos casos em que o diagnóstico anátomo-patológico de CEC foi confirmado, o paciente foi incluído na presente pesquisa e encaminhado celeremente a Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP ou UNISA, conforme a disponibilidade, para tratamento de sua neoplasia.

Para aqueles casos em que o diagnóstico anátomo-patológico foi diferente de CEC, os pacientes foram tratados de acordo com suas doenças e evidentemente excluídos do trabalho.

3.2 Extração do DNA

Para as 60 amostras colhidas (50 do Grupo CEC e 10 do Grupo Controle) foi utilizado um protocolo de extração de DNA denominado “Fenol-Clorofórmio”, cuja descrição da metodologia é a seguinte:

1. Retirada do eppendorf do freezer
 2. Descongelamento à temperatura ambiente (Aproximadamente 30 minutos)
 3. Retirada do excesso de soro fisiológico por inversão do eppendorf
 4. Adição de 200 μ l do Tampão de Digestão
 5. Adição de 5 μ l de Proteinase K
 6. Colocação do eppendorf em temperatura entre 37 e 45° - OVERNIGHT
 7. Verificação da completa digestão do tecido
 8. Adição de 200 μ l de Fenol e adição de 200 μ l de Clorofórmio – **Agitação**
 9. Centrifugação por 10 minutos a 13.000 RPM
 10. Aspiração do sobrenadante e passagem para tubo limpo
 11. Adição de 450 μ l de Etanol absoluto e 10 μ l de acetato de sódio 3 molar para cada 100 μ l do sobrenadante
-

12. Agitação do tubo por inversão e congelamento a 20°C negativos OVERNIGHT para precipitação
13. Descongelamento à temperatura ambiente
14. Centrifugação por 15 minutos a 13.000 RPM
15. Desprezo do sobrenadante e observação do “pellet” de DNA
16. Lavagem cuidadosa do pellet com álcool 80 por duas vezes
17. Remoção do álcool através de evaporação por 5 minutos
18. Suspensão do DNA em 50µl de água
19. Armazenamento a 20° C negativos para posterior realização de PCR

3.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação em Cadeia pela Polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR) é um método extremamente sensível de detecção de DNA pois é capaz de amplificar centenas de milhares de vezes apenas algumas cópias do DNA viral presente na amostra. Após sua amplificação foi utilizado um KIT comercial para detecção de HPV denominado BIOPAP KIT (Biotools, Espanha). Este KIT possui a capacidade de detectar a presença de HPV e separá-los conforme seu potencial oncogênico em dois grupos denominados “Oncogênicos e não-oncogênicos” (Nomenclatura do fabricante).

Para cada ensaio foram amplificados, além das amostras, um controle negativo (substituição de DNA por água) e outro marcador de peso molecular.

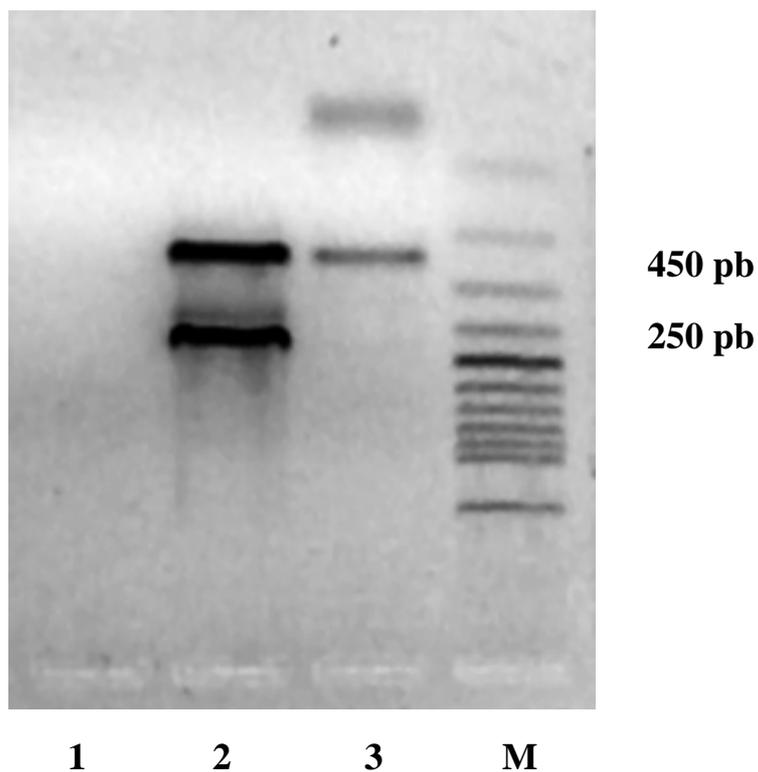
Metodologia seguida da PCR

1. Descongelamento natural do pellet de DNA por 30 minutos
 2. Descongelamento natural dos reagentes do KIT por 30 minutos
 3. Colocação de 4,5µl de MgCl₂ + 112,5µl de HPV mixture + 3µl de polimerase
-

4. Colocação em cada eppendorf de 20 μ l da mistura + 2 μ l do pellet de DNA + 3 μ l de água de milliqui
5. No eppendorf controle substituição do pellet por 2 μ l de água de milliqui
6. Colocação dos eppendorfs na cicladora após sua programação.
7. Amplificação 94° por 5 minutos (desnaturação inicial)
8. 35 ciclos a 94° por 30 segundos (desnaturação); 55° por 1 minuto (anelamento); 72° por 1 minuto (extensão).
9. Extensão final a 72° por 10 minutos
10. Colocação de Agarose + Tampão Eletrolítico + Brometo de etílico na cuba de eletroforese
11. Adição de 1 μ l de Azul de bromofenol com glicerol em cada eppendorf
12. Colocação de 15 μ l em cada orifício da cuba
13. Acionamento da cuba de eletroforese a 125 volts por 15 minutos
14. Leitura do resultado sobre negatoscópio UV

3.2.2 Interpretação dos resultados

Através da leitura das bandas iluminadas pelo negatoscópio ultravioleta, foi possível determinar a presença ou ausência de DNA do vírus HPV nas amostras. Nos casos em que houve positividade da reação, graças a diferença do número de pares de bases entre o grupo “oncogênico” (250pb) e “não-oncogênico” (450pb) foi possível ainda classificar as amostras num desses dois grupos. A figura 2 demonstra o resultado de um exame de PCR com a positividade de banda para HPV não-oncogênico na coluna 3 (450 pb), e de uma amostra positiva para HPV oncogênico na coluna 2 (250 pb).



- 1 = Amostra negativa
- 2 = Amostra positiva para HPV oncogênico
- 3 = Amostra positiva para HPV não oncogênico
- M = Marcador de peso molecular

Figura 2 - Resultado de PCR analisado através do negatoscópio ultra-violeta

3.2.3 Análise estatística

Para avaliar se a presença de HPV estava associada ao câncer de boca, utilizou-se o teste exato de Fisher. Para quantificar essa associação, quando possível, foi estimada a *odds ratio*, isto é, a “chance” de um paciente com HPV ter câncer de boca quando comparado a um paciente sem HPV, utilizando um modelo de regressão logística univariado. A variável resposta nesse modelo foi a presença de câncer (sim ou não) e a variável explicativa foi a presença de HPV (sim ou não).

Para avaliar se a amostra de pacientes com câncer de boca era semelhante à amostra de pacientes sem câncer de boca quanto à idade, utilizou-se o teste t-Student.

4. RESULTADOS

Das 50 amostras oriundas de carcinoma espino-celular de margem da língua, analisadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), 37 (74%) apresentaram-se positivas para os sub-tipos do papilomavírus denominados “oncogênicos”. Nenhuma amostra (0%) foi positiva exclusivamente para os sub-tipos “não-oncogênicos” (Figura 4). Das 10 amostras de tecido normal do denominado “grupo controle” analisadas pelo mesmo método para detecção do DNA do Papilomavírus humano, apenas 1 (10%) foi positiva para os sub-tipos denominados “não-oncogênico” e nenhuma amostra (0%) foi positiva para os sub-tipos “oncogênicos” (Figura 5).

4.1 Resultados

A tabela 1 apresenta algumas medidas descritivas para a idade dos pacientes com e sem câncer de boca. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as médias da idade nos dois grupos ($p = 0,14$).

Tabela 1 – Medidas descritivas para a idade dos pacientes com e sem câncer de boca (em anos)

	Grupo CEC	Grupo Normal
Média	59,8	55,0
Desvio padrão	9,7	6,6
Mínimo	42,0	43,0
Mediana	58,0	55,5
Máximo	81,0	67,0
No. De pacientes	50	10

$p = 0,14$ – Teste t-Student

Tabela 2 – Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de HPV e câncer de boca

		HPV				
		Sim		não		
CEC	sim	37	(74%)	13	(26%)	50
	não	1	(10%)	9	(90%)	10
		38	(63,3%)	22	(36,7%)	60

$p \leq 0,01$ – Teste exato de Fisher

A prevalência de HPV não foi a mesma nos dois grupos ($p \leq 0,01$). Segundo o modelo de regressão logística, pacientes com HPV oncogênicos têm 25,6 vezes mais chance (IC [95%] = 3,0 – 222,2) de ter câncer de língua do que pacientes sem HPV.

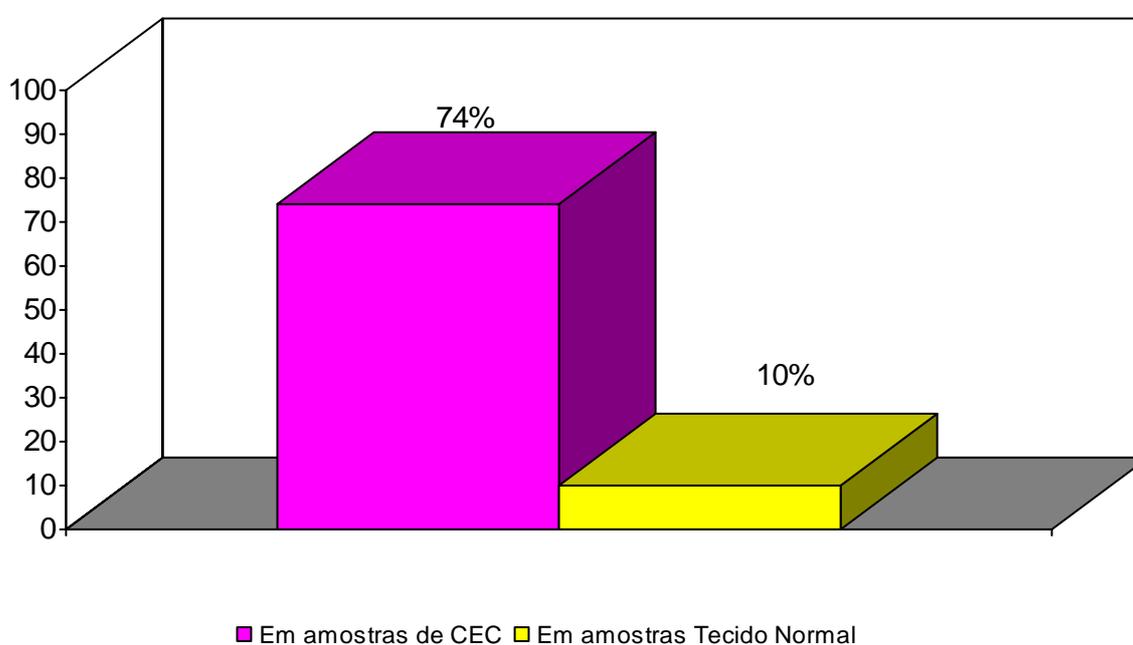


Figura 3 – Prevalência do Papilomavírus na Cavidade Oral.

Tabela 3 – Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de HPV oncogênicos e câncer de língua

		HPV				
		Sim		não		
CEC	sim	37	(74%)	13	(26%)	50
	não	0	(0%)	10	(100%)	10
		37	(61,7%)	23	(38,3%)	60

A prevalência de HPV não foi a mesma nos dois grupos ($p \leq 0,01$). Neste caso, como nenhum paciente sem câncer de língua apresentou HPV oncogênico, não foi possível obter estimativas do modelo de regressão logística para a *odds ratio*.

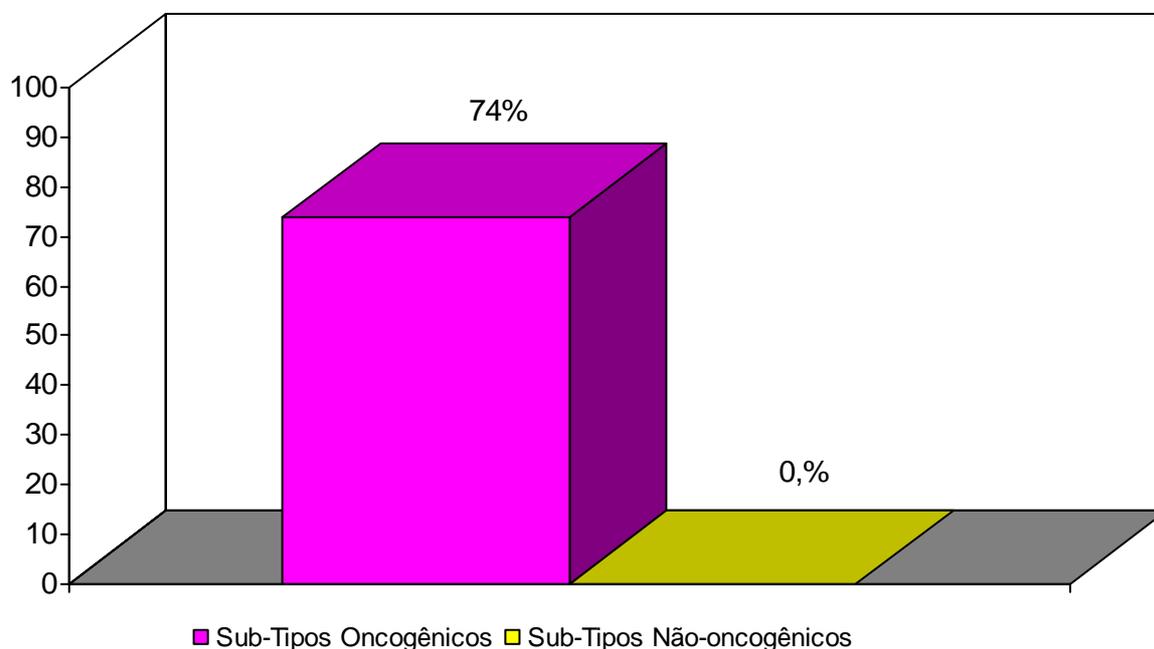


Figura 4 – Prevalência do Papilomavírus no Grupo CEC.

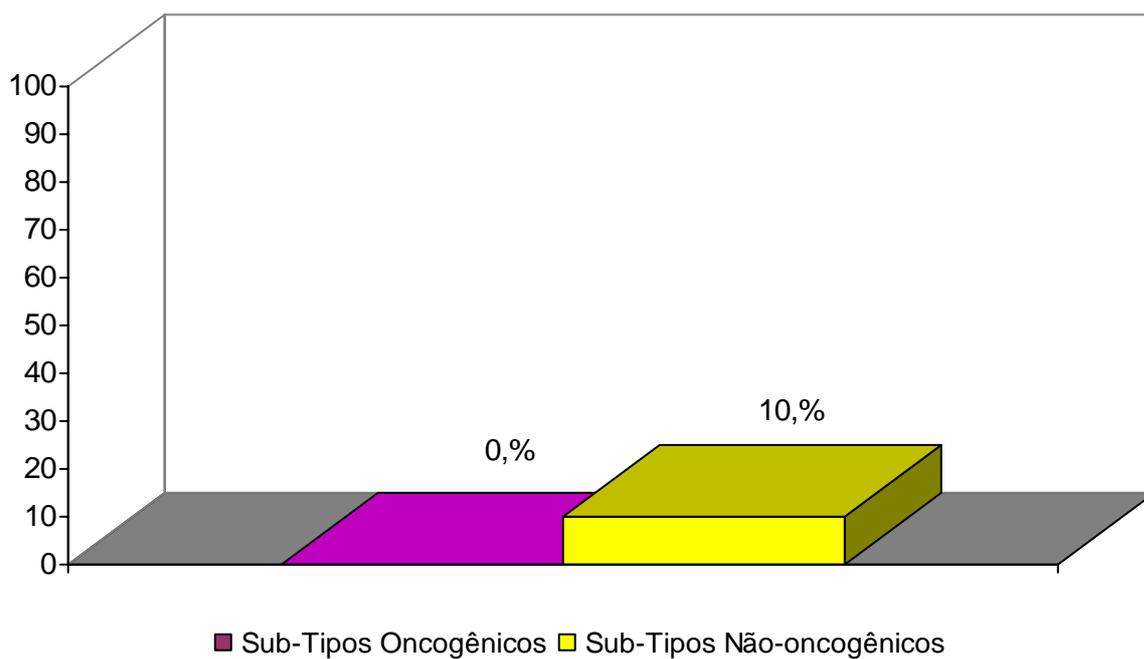


Figura 5 – Prevalência do Papilomavírus no Grupo Normal.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a prevalência dos HPVs no CEC da língua, buscando-se relacionar seus sub-tipos (oncogênicos ou não) e sua ocorrência nos tumores malignos epiteliais da margem da língua, bem como nos pacientes sem evidências clínicas de lesão. A seleção rigorosa do grupo avaliado (homens, brancos, acima de 40 anos de idade e fumantes) teve por objetivo buscar resultados mais fidedignos com relação à prevalência de câncer da língua. Optou-se ainda pelo método mais sensível capaz de detectar o genoma do HPV que é a Reação em Cadeia pela Polimerase. Nesse sentido todas as amostras foram colhidas e imediatamente congeladas a fim de se garantir a integridade do material genético. Discutiremos a seguir os dados obtidos.

O primeiro dado que se pode observar refere-se ao fato de que, do total de 50 amostras de carcinoma espino-celular biopsiadas na margem da língua, 74% foram positivas para os sub-tipos de HPV denominados oncogênicos, resultados estes que são semelhantes aos trabalhos levados a efeito por Woods et al (1993) com HPV em 78%; Nielsen et al (1996) com 72,5%; Cao et al (2000) com 72,5%; Bouda et al (2000) com 91% e Balaran et al (1995) com 74%.

Esses resultados sugerem, que o HPV apresenta potencial oncogênico na cavidade bucal a ser considerado.

Por outro lado, os resultados obtidos são conflitantes com diversos autores como Chang et al (1990) que obtiveram o HPV em 27,5% das amostras de CEC bucal analisadas; Kansky et al (2003) com 8,4%; Koppikar et al (2005) com 31%; Sand et al (2000) com 12,5% e principalmente com Herrero et al (2003).

Credita-se essa discrepância entre os resultados ao fato de que na maior parte dos casos onde a prevalência do HPV foi pequena houve a amplificação do DNA viral a partir de blocos de parafina, enquanto naqueles trabalhos onde a sua prevalência foi maior, assim como em nossos resultados, o DNA foi amplificado a partir de tecido fresco (congelado imediatamente após a biópsia). O material antes de ser colocado em bloco de parafina normalmente é fixado em formol a 10%. Os processos de formolização, parafinização e posterior desparafinização são capazes de degradar o DNA viral tornando sua detecção impossível ou dificultada.

A reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), é uma técnica confiável para a detecção do DNA do papilomavírus. Nesse sentido, Shroyer et al (1993), já utilizavam o PCR, para a evidência do DNA viral.

O diagnóstico histológico do CEC, através da biópsia e utilizado nesta pesquisa apresenta uma segurança de 100%, desde que todas as condições para esse fim sejam cumpridas.

Das 10 amostras componentes do gráfico 3, relativo ao Grupo Controle e que apresentavam mucosa clinicamente normal, apenas um, correspondente à 10% do total, foi positiva para o sub-tipo “não oncogênico”, e nenhuma amostra foi positiva para os sub-tipos oncogênicos. Nesse sentido, nossa pesquisa coincide com muitos dos trabalhos constantes do quadro 1, como Cao et al (2000) com 0%; Summersgill et al (2000) com 11,1%; Sand et al (2000) com 0%. Chang et al (1990), analisando 40 amostras de tecido normal, não encontraram evidências do HPV. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Nielsen et al (1996).

Os dados obtidos, a princípio, permitem concluir que a presença do HPV, em tecidos clinicamente normais é rara e quando este ocorre, normalmente são de sub-tipos não oncogênicos.

Considerando que em nossa amostra, 74% dos pacientes portadores de CEC de língua possuíam HPVs oncogênicos, podemos concluir que a presença destes vírus são fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer. Nesse sentido a abordagem clínica dos pacientes portadores de HPV na cavidade bucal deve ser reavaliada. Pacientes que possuam lesões cancerizáveis como por exemplo, a leucoplasia e HPV em suas cavidades bucais devem ter seus tratamentos planejados de forma a se tentar eliminar estas lesões.

Como a transmissão do HPV para a cavidade bucal ocorre principalmente por via sexual, mas pode também ocorrer através de fômites, sua prevenção torna-se muito dificultada. O desenvolvimento de vacinas que prometem combater em até 70% a infecção pelo HPV parece ser, neste momento, a única esperança de prevenção.

Como amplamente discutido na literatura, a diminuição da prevalência do câncer bucal depende de campanhas preventivas e esclarecimento sobre os fatores desencadeantes dessa patologia. Um grande progresso poderia ser feito caso a população considerada de risco fosse educada e esclarecida no sentido de procurar o Médico ou o Cirurgião Dentista, em intervalos freqüentes e que fossem incentivados a realizar o auto-exame da cavidade bucal. Formação acadêmica adequada sobre oncologia aos alunos de Medicina e Odontologia, tratamento das lesões cancerizáveis, eliminação do fumo e do álcool, remoção de fatores irritantes da cavidade bucal, prevenção e detecção precoce da presença do papilomavírus humano, constituem condições importantes para a prevenção e controle do câncer bucal.

6. CONCLUSÕES

O estudo de amostras frescas de carcinoma espino-celular de língua realizado através da reação em cadeia pela polimerase para detecção do genoma do papilomavírus humano nos permite concluir que:

1. O papilomavírus humano está presente no carcinoma espino-celular (CEC) da margem da língua num percentual de 74%, quando comparado com o grupo controle que apresentou prevalência de apenas 10%, sendo que nos pacientes em cujas amostras de tecido foi detectada a presença do HPV, em todos os casos, os sub-tipos encontrados foram os “oncogênicos”.
 2. Os pacientes portadores de HPV em seus sub-tipos oncogênicos na cavidade bucal possuem 25,6 vezes mais chances de desenvolver um carcinoma espino-celular de língua.
 3. A detecção do Papilomavírus Humano particularmente de seus sub-tipos “oncogênicos” em pacientes portadores de outros fatores de risco, pode contribuir para a prevenção do câncer bucal, já que alguns desses fatores podem ser eliminados e outros devem ser acompanhados de forma sistemática.
-

7. REFERÊNCIAS

Aggelopoulou EP, Skarlos D, Papadimitriou C, Kittas C, Troungos C. Human papillomavirus DNA detection in oral lesions in the Greek population. *Anticancer Res* 1999; mar-apr;19 (2B):1391-5.

Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;mar-apr; 20(2B):1301-5.

Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, Chan SY. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers-high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* 1995;may; 16; 61(4):450-4.

Bergeron C, Ferenczt A, Richart R. Underwear: Contamination by human papillomavirus. *Am J Obster Gynecol*; v.162, p25, 1990

Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli 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;jun;13(6):644-53.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*; 1995; 87: 796-803.

Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ, MacConnell P, Bodian C, Urken M, Biller H. HPV detection using polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Mod Pathol* 1994;sep;7(7):720-7.

Cao J, Zhang ZY, Zhang YX. Human papillomavirus infection and p 53 alteration in oral squamous cell carcinoma. *Chin Dent Res* 2000;nov;3(3):44-9.

Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, Karja J, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990;282(8):493-7.

Chatterjee R et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection in cytogenetics. *J Oral Pathol Med*; v.26; p.310-314, 1997.

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;may;10(3):163-6.

Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;jan;32B(1):55-62.

Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol* 1998; may;34(3):191-7.

Gillison, ML et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(9):709-20.

Herrero R; Castellsagué X; Pawlita M; Lissowska J; Kee F; Balaram P; Rajkumar T; Sridhar H; Rose B; Pintos J; Fernández L; Idris A; Sánchez MJ; Nieto A; Talamini R; Tavani A; Bosch FX; Reidel U; Snijders PJ; Meijer CJ; Viscidi R; Muñoz N; Franceschi S. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(23):1772-83.

Howley, PM. Papillomaviridae: The viruses and their replication. In; *Fundamental virology*, 3th ed. Philadelphia, p.2045-109.

Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, Mohar A. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;mar;99(3):311-5.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: www.inca.gov.br/cancer. Acesso em 15/04/2002.

Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *J Oral Pathol Med* 2001;30(7):385-8.

Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B, Golouh R. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol* 2003;47(1):11-6.

Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2002;sep;38(6):591-6.

Koppikar P, deVilliers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. *Int J Cancer* 2005;mar;113(6):946-50.

Miller CS, Johnstone BM. 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;jun;91(6):622-35.

Miller CS, Zeuss MS, White DK. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;may;77(5):480-6.

- Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998;nov-dec;18(6B):4765-8.
- Mork J et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine* 2001;344(15):1125-31
- Nielsen H, Norrild B, Vedofte P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur j Cancer B Oral Oncol* 1996;(32):264-70.
- Niv A, Sion-Vardi N, Gatot A, Nash M, Fliss DM. Identification and typing of human papillomavirus (HPV) in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Laryngol Otol* 2000;jan;114(1):41-6.
- Ostwald C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Loning Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994;may;23(5):220-5.
- Pereyra EAG, Guerra DMM, Linhares IM. Vírus do papiloma humano - Etiopatogenia. In Halbe H. *Tratado de ginecologia*. 2ª ed. Brasil, Rocca, p.843-9, 1994.
- Premoli-De-Percoco G, Ramirez JL. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *J Oral Pathol Med* 2001;jul;30(6):355-61.
- Rozendal AL, Walboomers JMM, van der Linden JC, Voorhost FJ, Kenemans P, Helmerhost TJM, Ballegooijen M. PCR based high-risk hpv test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of womenwith cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer*; v.68, p.766-9, 1996.
- Sand L, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res* 2000;mar-apr;20(2B):1183-8.
- Shroyer KR, Greer RO, Fankhouser CA, McGuirt WF, Marshall R. Detection of human papillomavirus DNA in oral verrucous carcinoma by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1993;nov;6(6):669-72.
- Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(3):334-9.
- Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;dec;12(6):418-24.
- Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. *Advanc Canc Res*. V.71, p.321-341, 1997
-

Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storthz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1993;mar;22(3):101-8.

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;jan;33(1):71-4.

zur Hausen H. Cell-virus gene balance hypothesis of carcinogenesis. *Behring Inst Mitt*. 1977;61:23-30.

zur Hausen H. Papillomavirus causing câncer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9), 690-8.

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento de livre e esclarecimento

UNIFESP –EPM / UNISA SETOR DE ESTOMATOLOGIA / DISCIPLINAS DE OTORRINOLARINGOLOGIA E DERMATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA:

Estudo comparativo da prevalência do papilomavírus humano -HPV na mucosa normal e carcinoma espino-celular da cavidade oral

O HPV (papilomavírus) é um vírus que possui mais de 100 sub-tipos diferentes e que pode provocar inúmeras doenças, como por exemplo: As verrugas vulgares e o condiloma (“crista de galo”) e sabidamente é um dos fatores importantes para o aparecimento do câncer de colo de útero nas mulheres.

O objetivo deste trabalho é determinar se existe relação entre este vírus e o câncer de boca, contribuindo desta forma para que no futuro, o diagnóstico desta doença possa ser feito o mais precocemente possível, o que sem dúvida levará a cura de mais pessoas.

Para que o Sr. possa participar desta pesquisa, iremos extrair uma pequena amostras da mucosa que recobre a margem de sua língua (para pacientes sem lesão oral), ou da área da lesão de boca. Para os pacientes portadores de lesão, o fragmento retirado será dividido para ser utilizado tanto para o exame anátomo-patológico, quanto para a pesquisa. Para retirar as amostras de tecido, iremos anestésiar a região pelo mesmo método usado nos tratamentos dentários e após a remoção do fragmento iremos quando necessário dar um ponto com fio de sutura que não requer sua remoção posterior.

O procedimento de remoção do fragmento não apresenta qualquer risco para a saúde. Se você tiver qualquer problema ou dúvida durante a sua participação na pesquisa poderá comunicar-se pelos telefones (011) 5576-4395 /9169-6906 ou vir neste ambulatório as 6^a. das 8:00 às 12:00 h e procurar o Dr. Carlos Eduardo Xavier dos Santos Ribeiro da Silva.

A participação na pesquisa não é obrigatória e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo no seu tratamento de rotina. As consultas serão gratuitas e não haverá compensação em dinheiro pela sua participação.

Com os dados obtidos nessa pesquisa, você estará ajudando imensamente outras pessoas, na medida em que, poderemos compreender melhor como essa doença aparece e como poderemos tratá-la de forma melhor e talvez até definitiva.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o Estudo comparativo da prevalência do papilomavírus humano -HPV na mucosa normal e carcinoma espino-celular da cavidade oral.

Eu, _____ discuti com o Dr. Carlos Eduardo Xavier dos Santos Ribeiro da Silva sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Carlos Eduardo X. S. Ribeiro da Silva

Data ____/____/____

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UNIFESP)



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 28 de junho de 2002

CEP Nº **0498/02**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): CARLOS EDUARDO XAVIER DOS SANTOS RIBEIRO DA SILVA

Disciplina/Departamento: Otorrinolaringologia Pediátrica/Otorrinolaringologia

Ref.: Projeto de Pesquisa

Estudo comparativo da prevalência do papilomavírus humano (HPV) na mucosa normal, leucoplasia e carcinoma espino-celular da cavidade oral

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **25/12/02**

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UNISA)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP nº 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER Nº 45-a/2002

REGISTRO CEP UNISA Nº 67/2002 – Apresentado em 28/08/2002

Projeto de Pesquisa : “Estudo comparativo da prevalência do Papilomavirus humano(HPV) na mucosa normal, leucoplasia e carcinoma espino-celular da cavidade oral”.

Pesquisador Responsável : Prof. Carlos Eduardo Xavier dos Santos Ribeiro da Silva

Instituição: Universidade de Santo Amaro – UNISA – SP – Faculdade de Odontologia

Área Temática : Odontologia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas – CEP UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, e após apresentada a justificativa por parte do investigador principal para “A biopsia do grupo de controle será realizada em mucosa lingual sem evidências histológicas visíveis através do exame clínico”, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto a ser realizado em parceria com a UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo.

Situação: Aprovado em 04/12/2002

São Paulo, 04 de Dezembro de 2002

PROF. DR. LIBERATO JOHN ALPHONSE DI DIO
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Anexo 4 – Tabela de Pacientes

Controle	Paciente	Idade	Grupo	HPV "alto risco"	HPV "baixo risco"
1	AAS	47	CEC	1	0
2	JPM	61	CEC	1	0
3	MQS	53	CEC	1	0
4	AAS	55	CEC	1	0
5	CAS	63	CEC	1	0
6	RFC	55	CEC	1	0
7	ASS	58	CEC	1	0
8	AJS	49	CEC	0	0
9	GASN	42	CEC	1	0
10	HLY	56	CEC	1	0
11	JRS	78	CEC	1	0
12	TF	54	CEC	0	0
13	RL	58	CEC	1	0
14	QOL	74	CEC	1	0
15	MC	50	CEC	1	0
16	JCS	53	CEC	1	0
17	MFS	72	CEC	1	0
18	PFG	80	CEC	1	0
19	JGG	58	CEC	1	0
20	EVN	64	CEC	0	0
21	ACR	44	CEC	1	0
22	PAM	51	CEC	0	0
23	HÁ	66	CEC	1	0
24	RAC	63	CEC	0	0
25	PLAM	59	CEC	1	0
26	AFT	49	CEC	1	0
27	AJS	81	CEC	0	0
28	PB	77	CEC	0	0
29	DMC	59	CEC	1	0
30	SSN	68	CEC	1	0
31	POD	73	CEC	1	0
32	AAMP	77	CEC	1	0
33	HCB	54	CEC	1	0
34	PLMB	58	CEC	1	0
35	TRI	49	CEC	1	0
36	BPS	51	CEC	1	0
37	PMN	69	CEC	0	0
38	FRG	68	CEC	1	0
39	MCL	55	CEC	1	0
40	OV	49	CEC	0	0
41	WAJ	56	CEC	0	0
42	DAD	62	CEC	1	0
43	SB	67	CEC	1	0
44	MHCF	56	CEC	1	0
45	MMS	58	CEC	1	0
46	PJB	50	CEC	1	0
47	RGTS	61	CEC	0	0
48	HR	66	CEC	0	0
49	UGR	53	CEC	1	0
50	ABS	60	CEC	0	0
51	VRL	55	NORMAL	0	0
52	JO	48	NORMAL	0	1
53	SS	51	NORMAL	0	0
54	GS	67	NORMAL	0	0
55	JFJ	54	NORMAL	0	0
56	CAL	56	NORMAL	0	0
57	FT	59	NORMAL	0	0
58	PHOS	43	NORMAL	0	0
59	JCCM	59	NORMAL	0	0
60	RUT	58	NORMAL	0	0

Anexo 5 – FICHA CLÍNICA (PROTOCOLO HPV / CÂNCER BUCAL)

AMBULATÓRIO DE ESTOMATOLOGIA – UNIFESP/UNISA

NOME: _____

NASC. ____/____/____ SEXO: _____ RAÇA: _____

ENDEREÇO: _____ N° _____ COMPL _____

CEP: _____ - _____ FONE: _____ CELULAR: _____

FUMANTE _____ Sim Não Tempo de uso _____

Quantidade diária _____ Marca comercial _____

ETILISTA _____ Sim Não Tempo de uso _____

Quantidade diária _____ Tipo de bebida _____

HISTÓRIA MÉDICA _____

HISTÓRIA ESTOMATOLÓGICA _____

ANTECEDENTES FAMILIARES _____

DESCRIÇÃO DA LESÃO _____

ENCAMINHADO AP ____/____/____ RESULTADO AP _____

CONTROLE N° _____ RESULTADO PCR _____

ENCAMINHADO PARA: _____

Abstract

The oncogenic human papillomavirus (HPVs) are important agents in the genesis of gynecological cancer and have been also related to mouth cancer. Aiming to assess the relation between HPV and squamous cell carcinoma (SCC) of the tongue, 50 white male smokers with a histological diagnosis of SCC and a control group composed of 10 subjects with no clinical evidence of lesions in the tongue were selected. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of the HPV genome in fresh tissue samples from SCC in the edge of the mouth. Thirty-seven patients (74%) had a positive PCR for oncogenic papillomavirus, and in the control group only one sample (10%) was positive for non-oncogenic papillomavirus. Based on the statistical analysis, we concluded patients with oncogenic papillomavirus in the oral cavity are 25.6-fold more likely to develop SCC of the tongue and must be systematically followed-up by clinical and complementary tests.

Bibliografia Consultada

Braga ME, Rother ET. Como elaborar sua tese: estrutura e referência. [S.N.]: São Paulo, 2001.

Ferreira ABH. Dicionário Aurélio Eletrônico – Século XXI, versão 3.0 – Novembro/1999. Versão integral do Novo Dicionário Aurélio – Século XXI, Editora Nova Fronteira

Ganância MM, Pontes PAL. Metodologia científica: Normatização para redação de teses. São Paulo; 2005.

Siegel S. Estatística não-paramétrica. São Paulo:McGraw-Hill;1975.