

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DETECÇÃO MOLECULAR E GENOTIPAGEM DO PAPILOMA
VÍRUS HUMANO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ORAL

Bolsista: Jéssica Lorena dos Santos Mathias, CNPq

Manaus
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL
PIB-S/0032/2009
DETECÇÃO MOLECULAR E GENOTIPAGEM DO PAPILOMA
VÍRUS HUMANO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ORAL

Bolsista: Jéssica Lorena dos Santos Mathias, CNPq
Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Maria Borborema dos Santos

Manaus
2010

RESUMO

A forma mais prevalente de câncer em boca é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO), que representa em torno de 90% das neoplasias malignas orais e, entre os múltiplos fatores de risco relacionado à etiologia viral, o papilomavírus humano (HPV) é o vírus mais comumente citado na literatura como envolvido na carcinogênese oral. Este trabalho propôs-se avaliar a presença do HPV em casos de CCEO diagnosticados na Fundação Centro de Controle de Oncologia – FCECON no período de agosto de 2009 a fevereiro de 2010. Trata-se de um estudo descritivo transversal analítico no qual foram analisadas variáveis de exposição e o resultado da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção do HPV. Foram incluídas no estudo 31 amostras com confirmação histopatológica de CCEO, as quais foram amplificadas por PCR para detecção do HPV utilizando iniciadores que amplificam a região L1 do capsídeo viral. A amplificação inicial utilizou os iniciadores degenerados MY09 e MY11, seguindo-se *Nested* PCR com os iniciadores GP5 e GP6, que geram um fragmento amplificado de 450 pb e 150 pb, respectivamente. A população estudada apresentou o típico físico da epidemiologia do câncer bucal, sendo constituída principalmente por homens, com média de idade superior a 59 anos. Quando se analisou o hábito de fumar e etilismo crônico verificou-se que 77,8% eram fumantes e relatavam etilismo crônico. Das 31 amostras, 29% (9/31) foram positivas para o DNA do HPV, no qual as mesmas apresentaram uma predominância para o tamanho da lesão extensa. Observou-se também, que dentre os 6 casos de lesões no dorso da língua, 3 foram HPV-positivas, e dentre os 5 casos de lesões no soalho bucal, 2 casos foram relatados a presença do Papilomavírus. Portanto, acredita-se que com o avanço da tecnologia, a detecção do HPV tornou-se cada vez mais precisa, permitindo correlacionar o vírus ao desenvolvimento neoplásico. No entanto, ainda está longe de se poder estabelecer com precisão o real papel desse vírus no câncer bucal, uma vez que a presença de diversos carcinógenos agindo simultaneamente, impeça concluir com mais precisão sua ação carcinogênica.

Palavra-chave: Carcinoma de células escamosas oral (CCEO); Papilomavírus Humano (HPV); Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

ABSTRACTS

The most prevalent form of cancer in the mouth are squamous cell carcinoma (OSCC), which represents around 90% of malignant neoplasms and oral, among the multiple risk factors related to viral diseases, human papillomavirus (HPV) is the viruses most commonly cited in the literature as involved in oral carcinogenesis. This study aimed to evaluate the presence of HPV in cases of OSCC diagnosed in the Foundation Center of Oncology - FCECON from August 2009 to February 2010. This is a cross-sectional analytical study that analyzed the exposure variables and outcome of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of HPV. This study included 31 samples with histopathological confirmation of OSCC, which were amplified by PCR to detect HPV DNA using primers that amplify the L1 region of the viral capsid. The initial amplification used the degenerate primers MY09 and MY11, followed by nested PCR with GP5 and GP6, which generate an amplicon of 450 bp and 150 bp, respectively. The study population had the typical physical epidemiology of oral cancer, which consists primarily of men, average age over 59 years. When we analyzed the habit of smoking and chronic alcohol abuse was found that 77.8% were smokers and reported chronic alcoholism. Of the 31 samples, 29% (9 / 31) were positive for HPV DNA, in which they showed a predominance for the size of an extensive injury. It was also noted that among the 6 patients with lesions in the tongue, three were HPV-positive, and among the five cases of lesions in the mouth floor, two cases were reported the presence of papillomavirus. Therefore, it is believed that with the advancement of technology, HPV detection has become increasingly precise, allowing the virus to correlate to tumor development. However, it is still far from being able to establish accurately the true role of this virus in oral cancer, since the presence of several carcinogens acting simultaneously, prevent the conclusion more precisely its carcinogenic action.

Keyword: Squamous cell carcinoma (OSCC), Human Papillomavirus (HPV) Polymerase Chain Reaction (PCR).

LISTA DE ABREVIATURAS

CA – Carcinoma in situ

CAM – Centro de Apoio Multidisciplinar na Universidade Federal do Amazonas

CCEO – Carcinoma de Células Escamosas Orais

CDC – Centro de Controle de Doenças e Prevenção

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxi-nucleotídeo tri-fosfato

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido diamino-tricloro-acético

FCECON – Fundação Centro de Controle de Oncologia

HPV – Vírus do papiloma humano (*human immunodeficiency vírus*)

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MgCl₂ – cloreto de magnésio

µL – Microlitro

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction*)

Taq DNA polimerase – DNA polimerase isolada *Thermus aquaticus*

Tris-HCL – Tris (hidroximetil) com pH ajustado por HCl concentrado

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UV - Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular.....	18
Figura 02 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% evidenciando-se um fragmento de 265 pb resultante da amplificação do gene da Golgina localizado no cromossomo 15 humano nas reações C1, C2, C3, C4, C6, C7, C10, C14, C16, C17, C19, C25, C27, C29, Marcador (M) = 100 pb; C+13A= Controle positivo; Br = Branco	25
Figura 03. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1,0 µg/mL), evidenciando-se um fragmento de 450pb resultante da amplificação por PCR do gene L1, a partir dos iniciadores MY9 e MY11, evidenciando-se positividade a reação C25 /Marcador = 100 pb; C+= Controle positivo; Br = Branco.....	26
Figura 04. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% evidenciando-se um fragmento de 150pb resultante da amplificação por <i>Nested</i> PCR do gene L1, a partir dos iniciadores GP5 e GP6, evidenciado nas reações C08, C09, C11, C17, C18, C19, C22, C27, C31/Marcador = 100 pb; C+= Controle positivo; Br = Branco....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Relação da variável faixa etária com a presença de HPV.....	28
Tabela 02. Relação da variável sexo com a presença de HPV.....	28
Tabela 03 - Relação do número de casos de fumantes com a presença de HPV.....	28
Tabela 04 - Relação do número de casos de etilistas com a presença de HPV.....	29
Tabela 05. Distribuição do tamanho da lesão de acordo com a presença de HPV.....	29
Tabela 06. Relação da variável faixa etária com a presença de HPV.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Papel Viral	7
2.2 Papilomavírus Humano (HPV).....	7
2.3 Métodos de detecção do HPV	12
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivo específico	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.2 Amostras	16
4.3 Procedimentos	17
4.3.1 Obtenção das amostras	17
4.3.2 Diagnóstico Molecular do Papilomavírus Humano (HPV).....	17
4.3.3 Extração do DNA do HPV	19
4.3.4 Amplificação controle do DNA.....	19
4.3.5 Detecção de HPV-DNA	21
4.4 Avaliação dos dados epidemiológicos obtidos.....	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Viabilidade das amostras	25
5.2 Papilomavírus Humano em Carcinoma de Células Escamosas Orais.....	26
5.3 Faixa etária	28
5.4 Sexo	28
5.5 Hábito do Fumo	28
5.6 Etilismo Crônico.....	29
5.6 Tamanho da Lesão.....	29
5.7 Localização da lesão	29
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9. ANEXO	41
9.1 Parecer	41

1. INTRODUÇÃO

O câncer tem sido grande alvo de estudos e investigações científicas, dentro da patologia oral, por ser importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo, apesar da distribuição geográfica ser variável nos continentes. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer do Brasil, em previsão para o ano de 2006 e considerando as diversas localizações de neoplasias malignas, estima-se cerca de 10.060 novos casos no sexo masculino e 3.410 no sexo feminino para o câncer oral (BRASIL, 2006).

A forma mais prevalente de câncer em boca é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO), que representa aproximadamente 90% das neoplasias malignas orais e cerca de 38% dos tumores malignos da cabeça e pescoço (COSTA et al., 2000). Apesar dos grandes avanços e descobertas, o prognóstico desse tipo de câncer ainda é pobre, com taxa de sobrevida estimada de 56% em cinco anos (KADEMANI et al., 2005).

O carcinoma de células escamosas oral, também chamado de carcinoma de células escamosas oral, atinge mais homens do que mulheres, apesar da proporção sexo masculino: feminino estar declinando, sendo esta de aproximadamente 2:1 (REGEZI, SCIUBBA, 2000). A maioria dos casos ocorre na faixa etária acima dos 50 anos, e os principais sítios de acometimento são a língua e o lábio inferior (NEVILLE et al., 2004; COSTA, ARAÚJO JÚNIOR, RAMOS, 2005).

Múltiplos fatores de risco estão envolvidos para o desenvolvimento do CCEO. Não há um agente ou fator causador isolado, claramente definido ou aceito, mas tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar em atividade. Fatores intrínsecos como alterações genéticas, deficiências nutricionais e imunossupressão; e fatores extrínsecos como raios solares, fumo, álcool, e alguns vírus têm sido apontados como possíveis agentes etiológicos (BOUDA et al., 2000; UOBE et al., 2001; VENTURI et al., 2004). Com relação à etiologia viral, o papilomavírus humano (HPV) é o vírus mais comumente citado na literatura como envolvido na carcinogênese oral (MILLER, JOHNSTONE, 2001; SCULLY, 2005).

Os três maiores estímulos carcinogênicos, dentre esses os agentes químicos (fumo e álcool), físicos (radiação) e infecciosos (vírus oncogênicos) podem modificar a estrutura dos genes por produzirem mutação de ponto, deleção ou inserção, promovendo, por conseguinte múltiplas alterações no genoma. O acúmulo dessas

alterações genéticas, incluindo ativação ou supressão de oncogenes e genes supressores tumorais, leva ao desequilíbrio no ciclo celular gerando danos ao DNA celular e a perda do controle do ciclo de divisão da célula, favorecendo uma instabilidade genética (NAGPAL, DAS, 2003).

Embora o fumo e o álcool sejam fatores etiológicos bem estabelecidos na carcinogênese oral, apenas um pequeno número de usuários desses produtos desenvolve o câncer. Este fato desperta a possibilidade de um possível envolvimento de outros fatores agindo de forma sinérgica. O HPV pode atuar como um desses fatores, potencializando o desenvolvimento de neoplasia maligna com origem no epitélio de revestimento (OLIVEIRA, SOARES, COSTA, 2002; SILVA et al., 2005).

Syrjänen et al. (1983), foram os primeiros a relatarem a correlação entre o HPV e o câncer oral, e, desde então numerosos estudos epidemiológicos com o HPV em tecidos neoplásicos têm sido relatados (MILLER, JOHNSTONE, 2001).

Evidências da infecção pelo HPV, através da interação das suas proteínas bem como pela integração do vírus ao DNA da célula, têm mostrado que o HPV não é meramente um colonizador secundário, sugerindo-se fortemente um papel causal para esse vírus na carcinogênese oral (SCULLY, 2005).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer oral continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo. No Brasil, esta neoplasia corresponde a aproximadamente 4% de todos os tipos de cânceres (SOARES et al., 2002).

Dentre as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, cerca de 90% correspondem ao carcinoma de células escamosas oral (SCULLY, 2005). Acomete, principalmente, o sexo masculino na faixa etária dos 50 aos 80 anos de idade (NEVILLE et al., 1998). Múltiplos estímulos estão envolvidos no processo da carcinogênese oral. Existem substanciais evidências que o fumo exerce um papel de destaque nesse processo, especialmente quando sua ação é potencializada pelo álcool (NEVILLE et al., 2004, SOUZA et al., 2004). Entretanto, uma pequena proporção (15-20%) ocorre em pacientes sem história de tabagismo e etilismo, sugerindo a presença de outros fatores de risco (GILLISON et al., 2000). No desenvolvimento do câncer oral, existem outros fatores além do álcool e do fumo que estão comumente associados na gênese neoplásica, tais como: sífilis, deficiências nutricionais, sol (principalmente em lesões labiais), traumatismo, má higiene e irritação por bordas pontiagudas de dente ou dentaduras. Além desses, os vírus estão sendo amplamente investigados como suspeitos de desenvolverem o papel de agentes carcinogênicos (SCULLY, 2005).

Agentes biológicos também são possíveis fatores etiológicos, e dentre estes, o papilomavírus humano (HPV) vem sendo fortemente implicado no desenvolvimento desse processo (SCULLY, 2002; ZHANG et al. 2004).

A correlação entre o câncer e o HPV na mucosa oral ainda é inconclusiva (SOARES et al., 2002). Os estudos sobre o envolvimento do HPV na carcinogênese oral têm gerado resultados conflitantes, apresentando-se a taxa de detecção desse vírus altamente variável (estendendo de 0% a 100%) (BOUDA et al., 2000).

No trato genital, a associação entre o câncer e a infecção pelo HPV já está bem estabelecida (ZUR HAUSEN, 2000; McMURRAY et al., 2001). A infecção pelos HPV's oncogênicos é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo o HPV 16 o tipo mais frequentemente detectado nos carcinomas cervicais uterinos (BOER et al., 2005).

Em cavidade oral, os estudos sobre a participação do HPV no desenvolvimento do câncer são inconclusivos. Os índices de detecção deste vírus são extremamente variáveis, bem como os principais tipos virais encontrados. A pretensão deste estudo é avaliar a presença de HPV em câncer de boca através de métodos moleculares (PCR) e tipificá-los através de sequenciamento do gene L1.

Além disto, um enorme número de pessoas são expostas a tais fatores de risco e somente uma pequena proporção destes desenvolve CCEO (MILLER et al., 2001). Isso tem levado à procura de outros fatores de risco como deficiências imunológicas, nutricionais, fatores genéticos e participação de agentes microbiológicos. Dentre esses vem sendo considerada a contribuição de vírus com conhecido potencial oncogênico, como o Papilomavírus humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) e a proteína p53 que há cerca de 20 anos vêm sendo associados ao CCEO (SCULLY et al., 2002; LYPE et al., 2001). Além disso, inclui-se a participação da telomerase, uma das enzimas que auxiliam na manutenção da capacidade replicativa da célula (VELDMAN et al., 2001). O aumento da expressão da telomerase tem sido descrito no CCEO e em tumores malignos de outros sítios como o útero, pulmão, fígado, mama, entre outros (BELAIR et al., 1997).

Syrjanen et al.(1983) sugeriram o envolvimento do HPV com o câncer bucal, quando associaram as alterações celulares encontradas em lesões malignas e pré-malignas da boca às mesmas que ocorriam no câncer da cérvix uterina. O HPV 16 parece ser o tipo de HPV mais freqüente associado a carcinoma orais.

No Brasil a incidência de neoplasias malignas da cavidade oral difere substancialmente nas diferentes regiões, e esse fato se deve possivelmente às diferenças locais na prevalência dos fatores de risco (PINÊRA et al., 1996). Os fatores de risco que estão implicados na etiologia do carcinoma de células escamosas oral, dentre os quais, citamos o tabaco, betel, álcool, vírus e dieta, ao serem relacionados com a herança genética podem ter um efeito carcinogênico sobre as células normais dos sistemas respiratório e digestivo (GILLISON et al., 2000). O carcinoma epidermóide oral pode ocorrer em qualquer localização da boca, sendo os locais mais acometidos a língua, o lábio inferior e o assoalho bucal. Essas regiões são grandes facilitadoras da disseminação dos carcinomas para linfonodos regionais e/ou órgãos distantes (MILLON et al., 1994).

2.1 Papel Viral

A etiologia multifatorial do câncer é amplamente aceita, entretanto, além do papel dos fatores de risco ambientais e/ou fatores genéticos, uma etiologia infecciosa vem sendo defendida. Inicialmente, a sífilis foi implicada na etiologia do CCEO e subseqüentemente, espécies de *Cândida* foram incriminadas, entretanto, recentemente o interesse tem se voltado para a investigação da etiologia viral no CCEO (NEVILLE et al., 1998).

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (apoptose) é de vital importância para a sobrevivência de qualquer organismo vivo, e este equilíbrio pode ser quebrado por uma infecção viral, que pode culminar em transformação neoplásica (WATTRE et al., 1999). Numerosos produtos genéticos de origem viral podem ligar-se a genes regulatórios da proliferação e morte celular e alterar suas funções (WATTRE et al., 1999). O sinal inicial da apoptose pode ser inibido por proteínas de adenovírus (E1B 19 kDa e E3), mixomavírus (MT2), bacilovírus (iap), herpes simples vírus e citomegalovírus, e induzido por mixovírus e vírus da hepatite C (WATTRE et al., 1999). Além disso, a transdução de sinais para a morte celular (p53, pRb, bcl-2) e a transativação de proto-oncogenes (c-myc, c-fos, c-jun) pode ser inibida por proteínas de adenovírus, EBV, citomegalovírus, entre outros (WATTRE et al., 1999). Como consequência, as células hospedeiras com infecção viral latente são levadas à proliferação sem regulação por reparo celular ou mesmo mecanismos de eliminação de células lesadas (WATTRE et al., 1999). Essas células podem continuar acumulando mutações induzidas por outros mecanismos capazes de causar danos aos DNA, como o tabaco, o álcool, carcinógenos, toxinas, entre outros, o que pode resultar no desenvolvimento de uma neoplasia maligna (WATTRE et al., 1999).

2.2 Papilomavírus Humano (HPV)

HPV é abreviatura utilizada para identificar o Papilomavírus humano, causador do condiloma acuminado (do grego *kondilus* = tumor redondo, e do latim *acuminare* = tornar pontudo), também conhecido como crista de galo ou verruga venérea (CAMARGOS, A.F.; HUGO de MELO, V., 2001; SARRUF, M.B.J; DIAS, E.P., 1997). Trata-se de um DNA-vírus, não cultivável, pertencente à família Papillomaviridae, é um pequeno vírus, de 55 nm de diâmetro, sem envelope, com 72 capsômeros, em um

capsídeo com simetria icosaédrica (TAVARES et al., 2000). Apresenta considerável tropismo pelo tecido epitelial e mucoso (GIRALDO et al., 1996; HOFFMANN et al., 1998).

Tem sido encontrado em lesões da cavidade oral e nasal, na conjuntiva, seios paranasais, laringe, mucosa traqueobrônquica, esôfago, uretra, trato anogenital e pele (CHANG et al., 1991; TERAJ et al., 1999).

Já foram identificados mais de 100 diferentes tipos de HPV em humanos (BOUDA et al., 2000). Desses, 24 tipos foram associados com lesões orais (HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) (OLIVEIRA et al., 2003).

Alguns destes, como o HPV 16, 18, 33 e 58, parecem ter um importante papel no desenvolvimento de certos tumores humanos, sendo considerados de alto risco (BOUDA et al., 2000). A infecção por HPV representa um fator de risco extremamente significativo para o Carcinoma de cérvix uterino (BOUDA et al., 2000). Os HPV de alto risco são a maior causa de cânceres anogenitais e têm sido implicados no câncer de cabeça e pescoço, pois a presença de DNA viral tem sido identificada nestes tumores (MORK et al., 2001). No entanto, seu papel no CCEO não foi ainda bem definido (BOUDA et al., 2000).

Baseado na associação do HPV como precursores de lesões e no aparecimento do câncer, os HPVs são agrupados nos tipos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e os de alto riscos (16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70) (BURD et al., 2003).

Atualmente, a infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa em todo o mundo. Em 1996, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimava em 500 mil a 1 milhão de casos novos, por ano, de infecção pelo HPV. Na ocasião, os índices de HPV eram suplantados apenas por infecção clamidiana (4 milhões) e tricomoníase (3 milhões) (OKADA et al., 2000).

Em 1996, o World Health Association considerou o HPV como uma importante causa de câncer cervical, em cerca de 99.7% dos casos em todo mundo (BURD et al., 2003).

Na mucosa oral, a prevalência do HPV e seu papel na patogênese de displasias e câncer não estão completamente esclarecidos (MILLER et al., 1996). Terai M. et al.(1999), num estudo sobre prevalência do HPV na cavidade oral normal em adultos, mostrou que o papilomavírus humano foi encontrado em mucosa oral normal pelo método PCR e observou a predominância de HPV-18 em infecção sub-clínica ou latente, sugerindo ser a cavidade oral um reservatório deste vírus e a infecção em combinação com outros fatores como cigarro e álcool podendo mais tarde desenvolver neoplasias.

A transmissão do HPV para a mucosa oral ocorre por auto-inoculação e através da prática de sexo oral (CHAPPUIS et al., 1998) A atividade sexual, quando exercida precocemente, aliada a um número alto de parceiros sexuais, juntamente com o fumo, paridade e outras doenças sexualmente transmissíveis podem contribuir para aumentar as chances de infecção pelo vírus (TAVARES et al., 2000). Na cavidade oral, é a língua o local mais freqüente de lesões pelo HPV, com incidência de 55% em um estudo realizado por Premoli de Percoco & Christensen (1992). Outros locais na boca são: palato, mucosa bucal, gengiva, lábios, tonsilas, úvula e assoalho da boca. O assoalho da boca é um local de muita saliva, onde agentes cancerígenos, como álcool e fumo, aí dissolvidos, permitem maior oportunidade para ação deletéria viral (SARRUF, M.B.J; DIAS, E.P., 1997). O período de incubação varia de 2 a 8 semanas e tem relação com a competência imune individual. A progressão da fase de incubação para de expressão ativa depende de três fatores: da permissividade celular, do tipo do vírus e do estado imune do hospedeiro (CAMARGOS, A.F.; HUGO de MELO, V., 2001).

O diagnóstico do papilomavírus humano na mucosa oral é dado pelo exame clínico, citologia, biópsia, imuno-histoquímica, hibridização do DNA, captura híbrida e PCR (*polimerase chain reaction*) (LANCELLOTTI et al., 2000). O aspecto citológico da infecção do HPV caracteriza-se por: critério maior: coilócitos com halos citoplasmáticos perinucleares e displasias nucleares; nos critérios menores: disceratocitos, metaplasia, macrócitos e binucleação (CAMARGOS, A.F.; HUGO de MELO, V., 2001).

A biópsia vai permitir o estudo histopatológico de amostra representativa da lesão, para confirmar e graduar a lesão, não sendo capaz de identificar o tipo do HPV, o que se obtém apenas através das técnicas de biologia molecular (hibridização *in situ*, captura híbrida e PCR – Reação em Cadeia de Polimerase) (LANCELLOTTI et al.,

2000). A PCR, como uma técnica que revolucionou a virologia, devido à sua sensibilidade extremamente alta, pode detectar até 1 genoma viral em 100.000 células. Sob ótimas condições experimentais, é o método de detecção mais sensível (OLIVEIRA et al. 2003).

Recentemente, os dois métodos mais amplamente usados e que têm equivalência em sensibilidade são captura híbrida e PCR com iniciadores gerais. Este tipo de PCR é potencialmente capaz de detectar todos os HPV mucosos. São usados iniciadores degenerados MY09/MY11, seguindo-se *Nested*-PCR com os iniciadores GP5+/GP6+ (OLIVEIRA et al. 2003).

De acordo com os estudos de vários autores, entre as alterações bucais possivelmente associadas ao HPV, é possível destacar as seguintes: papiloma, condiloma acuminado, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal, líquen plano, leucoplasia, carcinoma de células escamosas e carcinoma verrucoso (SARRUF, M.B.J; DIAS, E.P., 1997).

A infecção por HPV é comumente identificada pela detecção de DNA viral em células e tecidos, no entanto, como a infecção por HPV é focal ocorrem erros frequentes, como falsos positivos e falsos negativos, principalmente em indivíduos assintomáticos (MORK et al., 2001). No entanto, como a infecção por HPV é transitória, a ausência de DNA do HPV não descarta uma infecção prévia (MORK et al., 2001). Anticorpos para os antígenos do capsídeo do HPV demonstram ser marcadores confiáveis de infecção anterior e/ou presente e são usados em pesquisas séricas, onde a detecção costuma ser mais confiável (MORK et al., 2001).

Desde 1977 mais de 600 casos de carcinoma oral têm sido estudados pela identificação de HPV (PREMOLI-DE-PERCOCO et al., 1998). A prevalência citada, por diferentes técnicas, varia de 6% a 94%, sendo que o método de maior sensibilidade para o HPV parece ser a reação por cadeia polimerase (PCR) (BOUDA et al., 2000; PREMOLI-DE-PERCOCO et al., 1998). Apesar disto, a média de prevalência é menor que no câncer cervical. Entretanto, assim como no trato genital, os HPV-16 e 18 são de longe os tipos mais comumente encontrados, representando 80% das lesões HPV positivas (BOUDA et al., 2000; PREMOLI-DE-PERCOCO et al., 1998).

O HPV de alto risco é capaz de imortalizar células epiteliais orais e cervicais *in vitro* (MORK et al., 2001). As oncoproteínas E6 e E7 são os dois maiores oncogenes

virais expressos no tecido neoplásico e ambos estimulam a proliferação celular, sendo capazes de se ligar e inativar proteínas supressoras tumorais do hospedeiro, como a p53 e pRb, respectivamente (GASCO, M.; CROOK, T., 2003). A E6 pode ainda ativar telomerase, outro fator envolvido na carcinogênese. Assim sendo, as oncoproteínas virais são capazes de transformar ceratinócitos primários humanos dos tratos genital e respiratório superior, desequilibrando o mecanismo regulador do ciclo celular, levando a uma progressão genética para CCEO. Conseqüentemente, a infecção por HPV pode representar uma alternativa, funcionalmente comparável, para os mecanismos moleculares da carcinogênese (GILLISON et al., 2000).

Observa-se ainda uma tendência maior à positividade para HPV em pacientes não-etilistas e não-tabagistas, quando comparados aos usuários de tais substâncias (GILLISON et al., 2000). No entanto, a maior parte dos estudos concorda que não há correlação estatística entre a prevalência de HPV e a história de consumo de tabaco, embora ambas participem da carcinogênese na mucosa oral (GILLISON et al., 2000).

Um fato inesperado relatado é a redução de aproximadamente 40% no risco de óbito de pacientes com tumores HPV positivos (GILLISON et al., 2000) Um fato inesperado, pois estes tumores foram menos associados ao álcool e tabaco, e a estes não se pode aplicar o conceito de cancerização de campo, pois as infecções por HPV tendem a ser focais, o que primariamente deveria levar a um pior prognóstico, o que não é relatado (GILLISON et al., 2000). Os carcinomas HPV positivos parecem ser uma entidade distinta (acometem mais células basais e tem um componente inflamatório menor), com biologia distinta (menor mutação de p53), fatores de risco distintos (menor associação com tabaco e álcool) e um curso clínico distinto (maior sobrevida). A maior prevalência de positividade em CCEO é para o HPV de tipo 16, que chega a ser duas vezes maior do que em grupos controles, não havendo diferença de positividade entre homens e mulheres. Observa-se ainda maior positividade para HPV em adultos jovens e este fato seria responsável por uma diferença biológica, que neste caso aponta para um melhor prognóstico, fato contrário ao esperado (CRUZ et al., 1996).

Um estudo demonstra a correlação entre a detecção por PCR de HPV sérico e lesional e constata que os pacientes que apresentam HPV lesional apresentam HPV sérico somente nos estágios mais avançados da doença, sendo que quatro destes seis pacientes apresentaram metástase à distância e 50% destes pacientes com HPV sérico foram a óbito. No entanto, os 86% pacientes que apresentaram HPV lesional e ausência

de HPV sérico estão sem evidência da doença. Assim sendo, a presença de HPV sérico estaria correlacionada a um estágio mais avançado da doença e de pior prognóstico (CAPONE et al., 2000).

Premoli-De-Percoco et al. (1998) relatam a possibilidade de haver uma relação entre a infecção local de HPV e a sua detecção em outros sítios. O HPV tem o potencial de invadir outras células epiteliais após a infecção primária de um sítio epitelial, utilizando hibridização *in situ* em mulheres com CCEO, demonstrou a presença simultânea de HPV na citologia cervicovaginal e no CCEO em 23 de 28 casos. Neste caso, a positividade para HPV em CCEO foi maior na faixa etária dos 50-69 anos, grupo em que se esperaria uma menor prevalência de HPV. A história natural da infecção por HPV demonstra um pico entre as mulheres sexualmente ativas (15-25 anos) e tende a estabilizar-se após os 30 anos, devido à resposta imunológica, quando as mulheres geralmente apresentam resolução da infecção. No entanto, outras sofrem uma pequena displasia epitelial que depois de um longo período de incubação, combinado com fatores ambientais, culmina na transformação maligna das células epiteliais (PREMOLI-DE-PERCOCO et al., 1998).

2.3 Métodos de detecção do HPV

O diagnóstico do papilomavírus humano na mucosa oral pode ser suspeitado pelo exame clínico da lesão, citologia e biópsia. O aspecto citológico da infecção do HPV caracteriza-se por:

A. Critérios maiores: coilócitos clássicos, halos citoplasmáticos perinucleares e displasia nuclear.

B. Critérios menores: diskeratócitos, metaplasia imatura atípica, macrócitos e binucleação. Este método tem sensibilidade limitada e não tipa o HPV (LANCELLOTTI et al., 2000).

Os métodos usados na detecção do DNA do HPV nas lesões variam amplamente na sua sensibilidade e especificidade (DE VILLIERS, 1994). Estes são divididos em três categorias: os de baixa sensibilidade, que são imunohistoquímica e hibridização *in situ*, por só detectarem o vírus quando presente em mais de 10 cópias do DNA viral por célula. Os de moderada sensibilidade, que compreendem hibridização *Southern blot*, *dot blot* e hibridização *dot* reversa, por só detectarem o vírus quando de 1 a 10 cópias do

DNA viral por célula e o de alta sensibilidade, a reação da polimerização em cadeia, por detectar o vírus em menos de 1 cópia do DNA viral por célula (MILLER et al., 1996).

A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das partículas virais do HPV que se encontram nas lesões vistas na microscopia óptica em material incluído em parafina ou em preparados citológicos, sendo utilizados anticorpos policlonais contra antígenos específicos a vários tipos de HPV. A técnica é prejudicada pela disponibilidade limitada de anticorpos contra tipos de HPV específicos, devido à falta de propagação do vírus *in vitro*. Os anticorpos comercialmente disponíveis são originados contra antígenos do capsídeo de papilomavírus de bovino, com reação cruzada para HPVs (CASTRO et al., 2006).

Os testes de hibridização são atualmente os métodos de escolha para a detecção do DNA ou RNA do HPV em esfregaços ou amostras de tecidos. São realizados diretamente ou após a amplificação do DNA e RNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O princípio básico destas técnicas de hibridização é a formação dupla entre a fita única de DNA ou moléculas de RNA ou fita dupla de DNA desnaturado derivado de tipos de HPV clonados e a molécula de ácido nucléico viral presente na célula, que representa o alvo do teste de hibridização (DE VILLIERS, 1994).

A hibridização de *Southern blot* é utilizada para detecção do DNA do HPV no DNA de biópsias e é considerada como "padrão ouro" para detecção do genoma do HPV. É um teste sensível e altamente específico, consistindo num valioso instrumento de pesquisa, mas não tem aplicação para testes de rotina clínica por ser demorado e trabalhoso (DE VILLIERS, 1994).

Outro método de hibridização recentemente desenvolvido é a captura híbrida (HCA), que não distingue entre os tipos específicos de HPV e a sua aplicabilidade como método de pesquisa é limitado, mas pode representar um bom teste para o uso clínico de rotina (CASTRO et al., 2006).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica que revolucionou a virologia, devido à sua sensibilidade extremamente alta (TAVARES et al., 2000). Caracteriza-se pela amplificação de quantidades diminutas de seqüência de DNA-alvo em diversos milhões de vezes. É um processo térmico cíclico que inclui três etapas: desnaturação onde a fita dupla de DNA é separada em fitas simples; anelamento, onde

os iniciadores anelam especificamente com as suas seqüências complementares de DNA-alvo fita simples, e finalmente, a extensão do iniciador, onde um DNA polimerase termoestável gera fitas "filhas" de DNA que atravessam a região entre dois iniciadores. A partir de então as duplas fitas recém-geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente. Os iniciadores (*primers*) podem ser: os iniciadores específicos do tipo, que detectam um tipo simples de HPV, ou os iniciadores *consensus* (também chamados gerais ou genéricos) que detectam um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação (GRAVITT et al., 2000).

A detecção do HPV pela PCR é geralmente realizada utilizando um dos iniciadores *consensus*, o MY09-MY11 ou o GP5/GP6 (GRAVITT et al., 2000). Atualmente, a PCR permite uma avaliação aprofundada dos dados epidemiológicos, incluindo a prevalência de infecções subclínicas ou latente. Entretanto ela tem as seguintes desvantagens: amplificação de quantidades minúsculas de DNA de HPV contaminantes, que podem levar a resultados falsos positivos. Cada método é limitado pela sensibilidade, pela especificidade, pela prática, pelo custo e pela disponibilidade comercial. A avaliação da eficácia de diferentes técnicas para a detecção do HPV é importante e fundamental para o estabelecimento do papel etiológico do HPV nas lesões orais (DE VILLIERS, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença do HPV através da técnica da PCR em casos de carcinoma de células escamosas oral.

3.2 Objetivo específico

Amplificar por PCR a região L1 do HPV e sequenciar os produtos amplificados para determinar o tipo de HPV envolvido.

Correlacionar os achados com dados referentes às características da população estudada (idade, confirmação histopatológica, hábitos, sexo etc).

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

Este é um estudo descritivo transversal analítico no qual foram analisadas variáveis de exposição e o resultado da PCR para detecção do HPV, no qual visou investigar a frequência do Papilomavírus humano e sequenciamento do gene L1 para tipificação viral em casos de Carcinoma de Células Escamosas Oral atendidas na FCECON-AM.

4.2 Amostras

Foram utilizadas as amostras de todos os casos diagnosticados de carcinoma de células escamosas oral – CCEO, confirmados por histopatologia e coletados no Hospital de referência no tratamento de câncer da cidade de Manaus/AM (FCECON) no período de agosto de 2009 a fevereiro de 2010. As amostras deste estudo foram parte integrante da tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da aluna Danielle Albuquerque Pires Rocha, intitulado Detecção do polimorfismo do gene E6 do Papilomavírus Humano em Carcinoma Epidermóide Oral (CAAE: 0202.0.115.000-09, 24 de julho de 2009), sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos e que tem como suporte financeiro o projeto Análise genômica de vírus isolados na Amazônia .

Foram incluídas no estudo todas as amostras com confirmação histopatológica de Carcinoma Células Escamosas Oral e as amostras que não apresentaram confirmação histopatológica foram excluídas do estudo.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas utilizando escovas descartáveis tipo *cito-brush*, obtendo raspados da mucosa oral no qual foram colocados em 400µL de TE. Os pacientes que foram encaminhados à procedimentos cirúrgicos, foi obtido, além do raspado da mucosa, um fragmento de biópsia. As amostras foram transportadas em gelo e armazenadas a -20°C no Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da PCR. Para este procedimentos, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente adicionando aos 400 µL da amostra, 400 µL da solução Tampão Proteolítico (TPK). Posteriormente, esta mistura foi incubada em banho-maria a 56°C por 1 hora e depois levou-se a fervura por 10 minutos.

SOLUÇÕES:

TE: Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH8,0

TPK: 900 µL de TE (Tris HCl 50 mM + EDTA 1 mM) pH 8,0

100 µL de Tween 20%

20 µL de proteinase K 10 mg/ml

4.3.2 Diagnóstico Molecular do Papilomavírus Humano (HPV)

As etapas executadas no laboratório de Diagnóstico Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir:

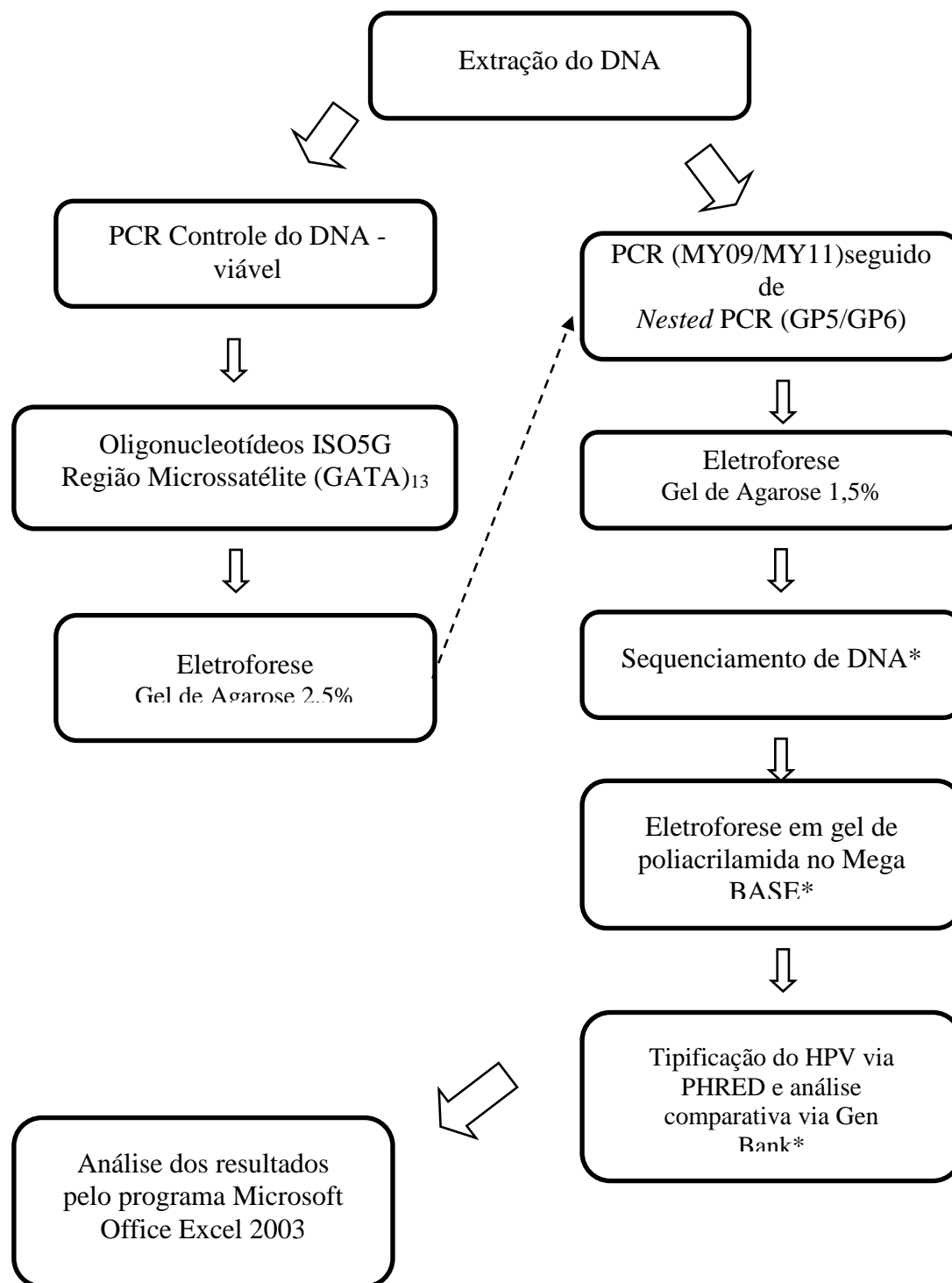


Figura 01: Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM.

* Etapas não realizadas porque o sequenciador automático Mega Base disponível no Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas, apresentou problemas técnicos desde Março de 2010 e até o momento não foi solucionado.

4.3.3 Extração do DNA do HPV

Após a digestão com proteinase K, as amostras da mucosa oral foram submetidas à extração do DNA do VHB pelo método fenol/clorofórmio.

Inicialmente, fora adicionado 400µL de Fenol Hidratado a 400µL da amostra que foi previamente digerida com proteinase K. Homogeneizou-se suavemente por 10 minutos seguidos de centrifugação a 12.000 rpm. Posteriormente, foi coletado o sobrenadante e adicionou-se 400 µL de Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1). Homogenizou-se essa mistura por 10 minutos e a seguir centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio e adicionado 400 µL de Clorofórmio Hidratado 1:1, agitou-se por 10 minutos e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a coleta do sobrenadante, para a precipitação do DNA viral foram adicionados 1/10 (10%) do volume do sobrenadante de NaCl 3M e 1000 µL de Etanol Absoluto Gelado. Deixou precipitar a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, o material precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos, descartando o sobrenadante cuidadosamente. Lavou-se o sedimento de DNA (*pellet*) com 500µL de Etanol a 70% Gelado, centrifugar a 8.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, foi descartado o sobrenadante cuidadosamente. Após centrifugação, secou o sedimento por aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e, ressuspendeu-se o sedimento de DNA com 50µL de água Milli-Q.

4.3.4 Amplificação controle do DNA

A eficiência da extração do DNA foi analisada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando *primers* específicos para o gene da golgina, no qual amplifica uma região microsatélite (GATA)13 do cromossomo 15 humano ISO5G descritos por Pontes, 2003. O sistema de reação e ciclagem foram especificados abaixo (Quadro 1 e 2).

Quadro 1- Sistema de Reação para o DNA genômico

Reagentes	Quantidades (µL)
H ₂ O MilliQ	2,2
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50mM	2,5
dNTP 2,5 mM	2,5
Iniciadores <i>Forward</i> ISO5G 5pmol	2,5
Iniciador <i>Reverse</i> ISO5G 5pmol	2,5
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/µL	0,3
DNA	5,0
Volume Final	20,0

Quadro 2- Ciclagem do DNA genômico

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Reação
1	95	2 minutos	Pré-Desnaturação
40	94	40 segundos	Desnaturação
	62	1 minuto	Anelamento
	70	1 minuto e 30 segundos	Extensão
1	60	10 minutos	Extensão final

1	4	Tempo infinito	Manutenção
---	---	----------------	------------

As reações de PCR foram realizadas com 40 ciclos de amplificação em aparelho termociclador *Applied Biosystems /Veriti 96 Well Thermal Cycler*, conforme o seguinte programa: quarenta segundos à 94°C para desnaturação, um minuto à 62°C para anelamento e um minuto e trinta segundos à 70°C para a síntese. Após os 40 ciclos, seguiram-se por uma hora a 60°C para extensão.

Após a amplificação com ISO5G, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5 % (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde o produto amplificado correspondente a 265 pb (PONTES, 2003) foi revelado em luz ultravioleta (UV) e fotografadas em máquina digital.

4.3.5 Detecção de HPV-DNA

Para detecção de HPV-DNA, utilizou-se iniciadores consenso, em reações aninhadas (*Nested*). As amostras que foram positivas para DNA genômico (presença de banda DNA correspondente a 265 pb) foram analisadas através de PCR para a presença de DNA de HPV. A primeira PCR para HPV fora realizada com um par de iniciadores genéricos designados MY09 (5` CGTCCMARRGCAWACTGATC 3`) e MY11 (5` GCMCAGGGWCATAAYAATGC 3`), que amplificaram regiões conservadas da região L1 de vários tipos de HPV. O fragmento amplificado tem uma extensão de cerca de 450pb. As reações foram preparadas conforme descrito abaixo (Quadro 3 e 4).

Quadro 3 - Sistema de Reação para o DNA do HPV (MY09 x MY11)

Reagentes	Quantidades (µL)
H ₂ O MilliQ	12,3

Tampão 5X	2,5
MgCl ₂ 25mM	2,0
dNTP 10 mM	0,5
Iniciadores <i>Forward</i> ISO5G 5pmol	2,5
Iniciador <i>Reverse</i> ISO5G 5pmol	2,5
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/μL	0,2
DNA	2,5
TOTAL	25,0

Quadro 4 - Ciclagem da PCR para DNA HPV com os iniciadores MY09 e MY11

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Reação
1	95	1 minuto	Pré-Desnaturação
40	95	1 minuto	Desnaturação
	55	1 minuto	Anelamento
	72	1 minuto	Extensão
1	72	5 minutos	Extensão final
1	4	Tempo infinito	Manutenção

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídeo (1μg/mL), e revelados por luz UV. Em cada conjunto de reações foram incluídas um controle negativo (branco de reação),

consistindo em um tubo com todos os ingredientes, excluindo o DNA extraído. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra comprovadamente positiva para HPV, já disponibilizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do CAM/UFAM.

As amostras negativas nesta reação de PCR foram submetidas a *nested*-PCR, no qual foi utilizado um par de iniciadores genéricos designados GP5+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3') e GP6+ (5'GAAAATAAACTGTAAATCAT ATTC3') (DE RODA HUSMAN et al., 1995), que flanqueiam um fragmento de cerca de 150 pares de bases do gene L1 do capsídeo viral, uma seqüência altamente conservada no genoma dos HPVs de mucosas (genital e oral), com pequenas variações entre os tipos individuais. O sistema de reação e ciclagem estão especificados abaixo (Quadro 5 e 6).

Quadro 5 – Sistema de Reação para o DNA do HPV (GP5 x GP6)

Reagentes	Quantidades (µL)
H2O MilliQ	11,8
Tampão 5X	5,0
MgCl ₂ 25mM	2,0
dNTP 10 mM	0,5
Iniciadores <i>Forward</i> ISO5G 5pmol	2,5
Iniciador <i>Reverse</i> ISO5G 5pmol	2,5
Taq DNA polimerase 5U/µL	0,2
DNA	0,5
TOTAL	25,0

Quadro 6- Ciclagem da PCR para DNA HPV com os iniciadores GP5 e GP6

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Reação
1	95	1 minuto	Pré-Desnaturação
40	95	1 minuto	Desnaturação
	55	1 minuto	Anelamento
	72	1 minuto	Extensão
1	72	5 minutos	Extensão final
1	4	Tempo infinito	Manutenção

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo (1,0 µg/mL) e visualizados através de transiluminador de luz UV, e fotografadas em máquina digital.

4.4 Avaliação dos dados epidemiológicos obtidos

A prevalência do HPV encontrada nas amostras foram analisadas em gráficos, tabelas e proporções, relacionando-se com a frequência de positividade e as características como idade e dados do questionário sócio-econômico realizado com os resultados encontrados. Estes dados foram avaliados no programa Microsoft Office Excel 2003.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 31 amostras, todas histologicamente diagnosticados com carcinoma de células escamosas oral (CCEO).

5.1 Viabilidade das amostras

Após extração do DNA, visando verificar a integridade do DNA, foram processadas 31 amostras para verificar a viabilidade das mesmas através do PCR para DNA genômico. Todas as amostras foram viáveis (Figura 03), nas quais foram encaminhadas ao procedimento da PCR para HPV. As amostras que não amplificavam, eram submetidas novamente à extração de DNA.

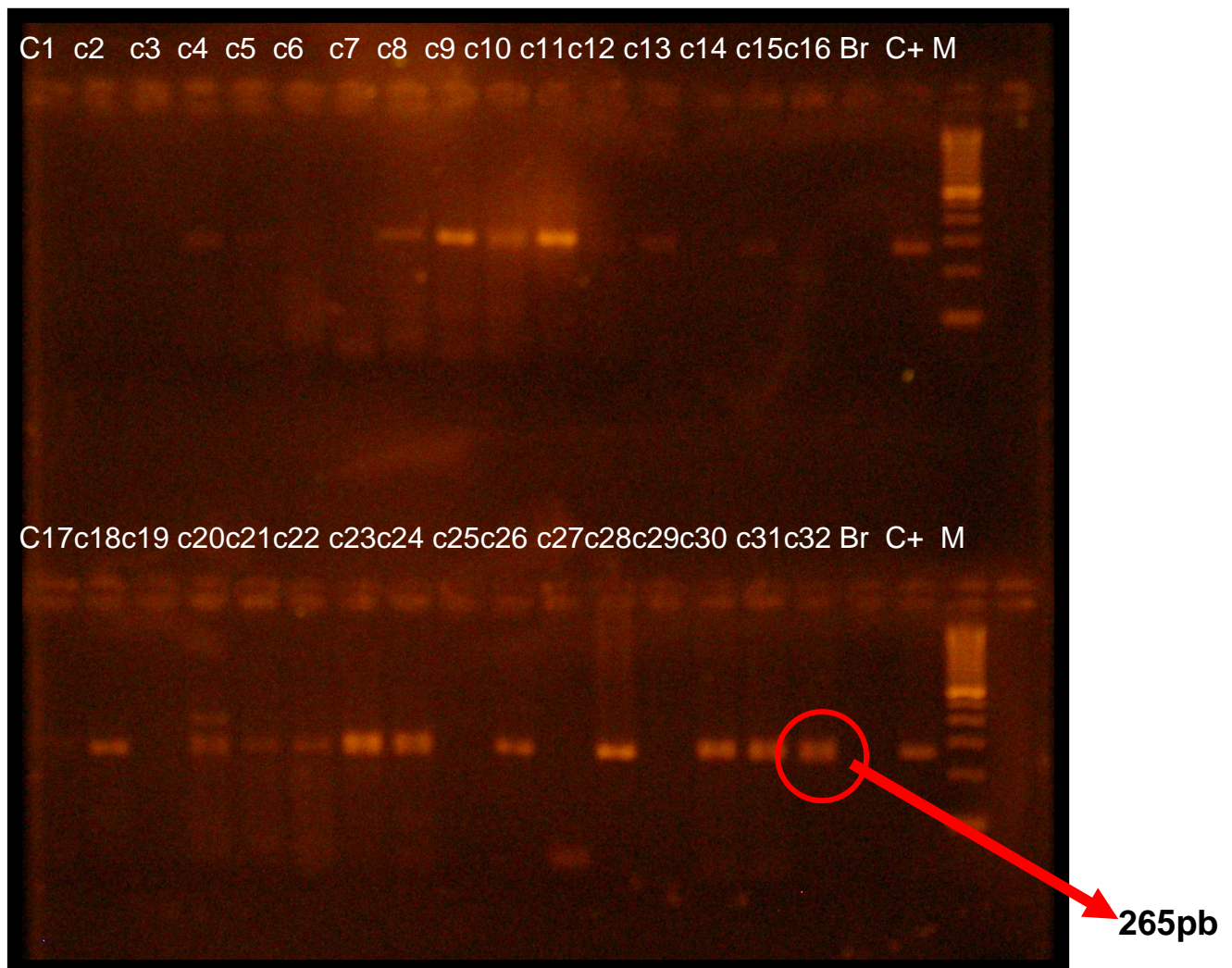


Figura 02. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% evidenciando-se um fragmento de 265 pb resultante da amplificação do gene da Golgina localizado no cromossomo 15 humano nas

reações C4, C5, C8, C9, C10, C11, C13, C15, C18, C20, C21, C22, C23, C24 C26, C28, C30, C31, C32, Marcador (M) = 100 pb; C+13A= Controle positivo; Br = Branco.

5.2 Papilomavírus Humano em Carcinoma de Células Escamosas Orais

Dentre as 31 amostras de pacientes apresentando casos de carcinoma epidermóide oral, 29% (9/31) amostras foram positivas para a presença de HPV (Figura 4 e 5).

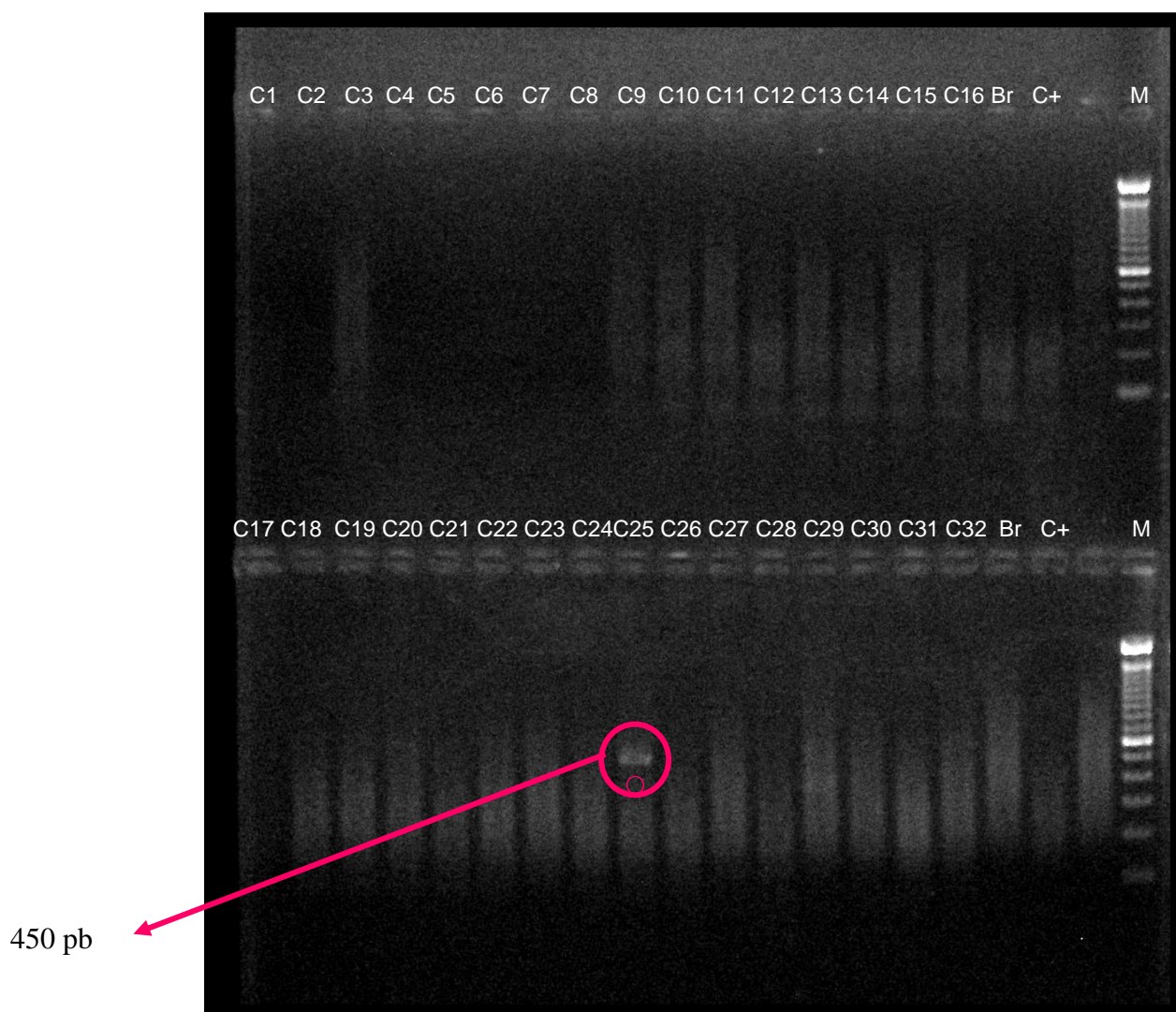


Figura 03. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1,0 $\mu\text{g/mL}$), evidenciando-se um fragmento de 450pb resultante da amplificação por PCR do gene L1, a partir dos iniciadores MY9 e MY11, evidenciando-se positividade a reação C25 /Marcador = 100 pb; C+= Controle positivo; Br = Branco.

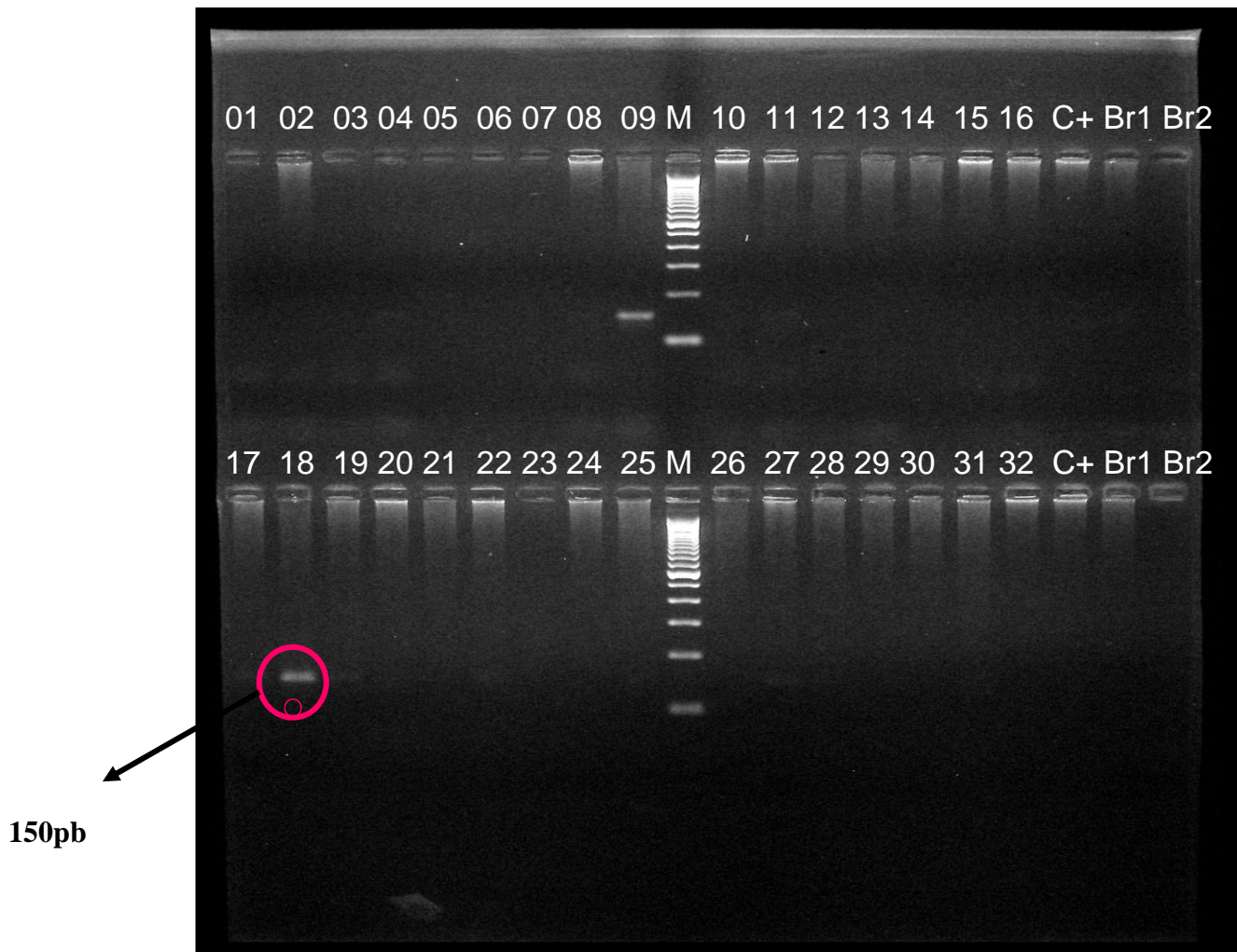


Figura 04. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% evidenciando-se um fragmento de 150pb resultante da amplificação por *Nested* PCR do gene L1, a partir dos iniciadores GP5 e GP6, evidenciado nas reações C08, C09, C11, C17, C18, C19, C22, C27, C31/Marcador = 100 pb; C+= Controle positivo; Br = Branco.

5.3 Faixa etária

A faixa etária dos pacientes do estudo variou entre os 38 aos 82 anos ($\bar{X} = 59,74$), no qual a predominância de idade entre os pacientes que apresentaram positividade para HPV ($n = 9$) variou entre os 38 a 67 anos, equivalendo a uma média de idade de 56,66 anos.

Tabela 01. Relação da variável faixa etária com a presença de HPV.

Variável	HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<i>Idade (anos)</i>	n = 9	n = 22	N = 31
Média ± Desvio padrão	56,66 ± 8,87	58,22 ± 10,40	59,74 ± 9,89
Intervalo	38 – 67	39 – 82	38 – 82
<i>Idade (Mediana = 56,5)</i>			
≤ Mediana	(n=4) 44,40%	(n=10) 45,40%	(n=14) 45,17%
> Mediana	(n=5) 55,60%	(n=12) 54,60%	(n=17) 54,83%

5.4 Sexo

De acordo com a observação do sexo dos pacientes deste estudo, constatou-se que 90,32% dos casos corresponderam aos homens e que somente 9,67% das mulheres participaram da pesquisa. Dentre os pacientes com presença do HPV, 88,88% (8/9) eram do sexo masculino e apenas 11,11% (1/9) eram do sexo feminino.

Tabela 02. Relação da variável sexo com a presença de HPV.

Variável	HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<i>Sexo</i>	n = 9	n = 22	N = 31
Homem	(n=8) 88,88%	(n=20) 90,90%	(n=28) 90,32%
Mulher	(n=1) 11,11%	(n=2) 9,10%	(n=3) 9,67%

5.5 Hábito do Fumo

Dentre as amostras que apresentaram positividade para HPV, 7 delas eram de fumantes há mais de 40 anos. A frequência do número de casos de HPV diretamente relacionados com o hábito do fumo foi de 77,8%, como apresenta o quadro a seguir:

Tabela 03. Relação do número de casos de fumantes com a presença de HPV.

Variável	HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<i>Fumantes</i>	n = 9	n = 22	N = 31
Sim	(n=7) 77,80%	(n=15) 68,18%	(n=22) 70,97%

Não	(n=2)	22,20%	(n=7)	31,81%	(n=9)	29,03%
-----	-------	--------	-------	--------	-------	--------

5.6 Etilismo Crônico

A frequência de pacientes com etilismo crônico relacionada com a presença de HPV foi de 77,8%. Apenas 22,2% dos pacientes com positividade para HPV não apresentaram esse fator predisponente ao câncer.

Tabela 04. Relação do número de casos de etilistas com a presença de HPV.

Variável	HPV				Total	
	Positivo		Negativo			
<i>Etilismo crônico</i>	n = 9		n = 22		N = 31	
Sim	(n=7)	77,80%	(n=11)	50,00%	(n=18)	58,07%
Não	(n=2)	22,20%	(n=11)	50,00%	(n=13)	41,93%

5.6 Tamanho da Lesão

Dentre os 9 casos com positividade para o HPV, 100% das amostras apresentaram tamanho da lesão extensa como apresenta o quadro a seguir:

Tabela 05. Distribuição do tamanho da lesão de acordo com a presença de HPV.

Variável	HPV				Total	
	Positivo		Negativo			
<i>Tamanho da Lesão</i>	N = 9		n = 22		N = 31	
Discreto	(n=0)	0,00%	(n=9)	40,90%	(n=9)	29,03%
Extenso	(n=9)	100,00%	(n=13)	59,10%	(n=22)	70,97%

5.7 Localização da lesão

Dos 31 pacientes, observou-se que dos 9 casos de carcinoma de células escamosas oral com positividade para o HPV, 3 deles tinham lesões localizadas no dorso da língua, 2 casos no soalho bucal, outro no palato mole, seguido de casos no palato duro e no rebordo alveolar, no qual pode-se observar na tabela abaixo:

Tabela 06. Relação da variável faixa etária com a presença de HPV.

Variável	HPV		
	Positivo	Negativo	Total
<i>Localização da lesão</i>	n = 9	n = 22	N = 31
Borda lateral da língua	0	3	3
Soalho bucal	2	3	5
Pilar amigdaliano esquerdo	0	1	1

Dorso da língua	3	3	6
Lábio superior	0	1	1
Palato mole	1	2	3
Rebordo alveolar	1	3	4
Orofaringe (amígdalas e faringe)	1	3	4
Palato duro	1	1	2
Mucosa jugal	0	1	1
Trígono retromolar	0	1	1

6. DISCUSSÃO

O papilomavírus (HPV) é o vírus mais transmitido sexualmente e tem grande importância na etiopatogenia do câncer do colo uterino, enquanto na mucosa oral não está completamente esclarecido. Atualmente, a prática do sexo oral e a variação de parceiros contribuem muito para elevar a transmissão do HPV na mucosa oral (THEREZITA, et al., 2004)

Vários trabalhos da literatura relatam que o diagnóstico do papilomavírus humano é dado pelo exame clínico, biópsia e através das técnicas de biologia molecular. No entanto, o exame clínico e a biópsia nos informa sobre as características da lesão sugestiva do HPV, enquanto os exames como PCR identificam os tipos do HPV, sendo estes considerados os exames de maior sensibilidade e os mais usados na atualidade (THEREZITA, et al., 2004).

Este estudo permitiu avaliar a frequência da detecção de HPV-DNA em lesões de Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) através da técnica da PCR, além de sequenciar os produtos amplificados para determinar o tipo de HPV envolvido. Entretanto, esta etapa do procedimento não foi realizada devido ao impedimento do uso sequenciador automático Mega Bace que encontrou-se inoperante durante o estudo devido a problemas técnicos.

De maneira geral, a correlação dos achados desta pesquisa com os dados referentes às características da população estudada mantiveram-se de acordo com a literatura. Portanto, constatou-se que acima dos 90% dos casos eram do sexo masculino, com média de idade superior a 59 anos, consumidores de tabaco e álcool. Nas pacientes do sexo feminino observou-se, também, expressiva história de tabagismo e etilismo crônico.

Observou-se também que a predominância de idade entre os pacientes de CCEO que apresentaram positividade para HPV (n = 9) variou entre os 38 a 67 anos, equivalendo a uma média de idade de 56,66 anos. A associação da idade à detecção de HPV-DNA segundo CRUZ et al. (1996), descreveu que CCEO de pacientes com menos de 60 anos tinham maior chance de serem HPV-DNA positivos, mas ao passo que

GIOVANELLI et al. (2002) notaram o aumento da chance de detecção de HPV-DNA com o aumento da idade, embora este aspecto ainda deva ser esclarecido.

Observou-se também que em amostras localizadas na língua e no soalho bucal apresentaram maior frequência na presença do HPV, portanto, a distribuição das lesões quanto à topografia intrabucal também encontrou-se de acordo com a literatura, uma vez que consta que estes sítios são os mais acometidos. Dentre os 6 casos de lesões no dorso da língua, 3 foram HPV-positivas, e dentre os 5 casos de lesões no soalho bucal, 2 casos foram relatados com presença do Papilomavírus. Embora a minoria das amostras de tamanho extenso apresentou positividade para o HPV, não deve-se descartar a possibilidade da influência da extensão da lesão sobre o diagnóstico.

O presente estudo relatou o envolvimento do HPV em 29% dos pacientes com carcinoma de células escamosas oral. Segundo BENEVIDES et al. (2006), a taxa de detecção de HPV-DNA em câncer bucal e em mucosa sã ou com lesões cancerizáveis é muito variável na literatura. Estudos baseados em PCR mostram positividade de menos de 5% até 100% (CRUZ et al., 1996; D`COSTA et al., 1998; SUGIYAMA et al., 2003, UOBE et al., 2001; GIOVANELLI et al., 2002; HERRERO et al., 2003; KOJIMA et al., 2002; SMITH et al., 2004; ZHANG et al., 2004; HANSSON et al. 2005). As maiores causas de variações nestes resultados é devido ao uso de diferentes métodos de investigação.

Deve-se considerar que o uso de PCR somente em um passo, seja com MY09/MY11 ou com GP5+/GP6+, produza mais resultados negativos que o uso de *nested-PCR*, *seminested-PCR* ou *autonested-PCR*, devido a menor sensibilidade (REMMERBACH et al., 2004). Como nem sempre se observou este fato na literatura, acredita-se que o papel etiológico do HPV em carcinoma de células oral ainda permaneça obscuro e controverso. Além disso, sabe-se que a carga viral de HPV em amostras bucais é baixa (SYRJANEN, 2005), demandando técnicas mais sensíveis para detecção deste vírus.

Estudos anteriores demonstram que pacientes com tumores HPV positivos exibem uma maior taxa de sobrevida quando comparados a pacientes com tumores HPV negativos. Devido a esta observação, a identificação do HPV torna-se de suma importância clínica, no qual aumenta cada vez mais a necessidade de implantar a rotina

do diagnóstico do HPV e divulgar os possíveis focos de transmissão como modo de prevenção do Câncer de boca (THEREZITA, et al., 2004).

No entanto, não podemos deixar de citar a influência de outros fatores predisponentes para a gênese viral, como o cigarro e o álcool, que assim como em outros estudos acredita-se no envolvimento desses fatores na composição dos resultados. Dentre os pacientes com positividade para o HPV, 77,8% dos casos trata-se etilistas crônicos e fumantes com esse hábito há mais de 40 anos.

Com o avanço da tecnologia e o advento de novas técnicas moleculares, a detecção de HPV tornou-se cada vez mais precisa, permitindo correlacionar o vírus ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Estudos realizados nos últimos anos permitem considerar o HPV como o agente causal do câncer de colo de útero. No entanto, ainda se está longe de se poder estabelecer com precisão o real papel desse vírus no câncer bucal. A presença de diversos carcinógenos, atuando simultaneamente, impede conclusões com mais precisão e apontam mesmo para uma atuação sinérgica do HPV com outros carcinógenos químicos e físicos, o que de fato potencializaria o desenvolvimento de uma neoplasia maligna.

7. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou uma frequência de HPV de 29% em amostras da mucosa oral de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Orais.
- A idade predominante entre as pacientes que apresentaram positividade para HPV (n = 9) variou entre os 38 a 67 anos, relativo a uma média de idade de 56 anos.
- A população estudada apresentou o típico físico da epidemiologia do câncer bucal, sendo constituída principalmente por homens, acima de 90%, com média de idade superior a 59 anos, tabagistas e consumidores de álcool.
- Dentre os 9 casos com positividade para o HPV, 100% das amostras apresentaram tamanho da lesão extensa.
- Dos 31 pacientes, observou-se que dos 9 casos de carcinoma de células escamosas oral com positividade para o HPV, 3 deles tinham lesões localizadas no dorso da língua, 2 casos no soalho bucal, outro no palato mole, seguido de casos no palato duro e no rebordo alveolar.
- Dentre os pacientes com positividade para o HPV, 77,8% dos casos tratase de etilistas crônicos e fumantes com esse hábito há mais de 40 anos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELAIR, C.D. et al. **Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation.** Proc Natl Acad Sci, USA 1997; 94:13677-82.

BENEVIDES-SANTOS, P.S. et al., **Frequência da infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) em lesões de câncer bucal e sua relação com o polimorfismo do códon 72 de p53 em pacientes atendidos no Estado do Amazonas.** Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2006 – AM.

BOUDA, M. et al. **High risk HPV type are frequently detected in potentially malignant and a malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa.** Mod Pathol, v.13, n.6, p.644-653, 2000.

BURD, E. M. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer.** Clinical Microbiology Reviews Jan 2003; p. 1-17.

CAMARGOS, A. F.; HUGO DE MELO, V. **Ginecologia ambulatorial.** Coopamed Belo Horizonte; 2001. p. 397-400.

CAPONE, R.B. et al. **Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV - associated head and neck squamous cell carcinoma.** Clin Cancer Res 2000; 6(11): 4171-5.

CASTRO, T. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I. **Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe.** Rev. Bras. Otorrinolaringol. vol.72 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2006.

CHANG, F. et al. **Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease.** J Oral Pathol Med 1991; 20: 305-17.

COSTA, A.L.L.et al. **Oral squamous cell carcinomas: retrospective study of 389 cases.** JDent Res, v.79, n.5, p.1094, 2000.

COSTA, A.L.L.; ARAÚJO JÚNIOR, R.F. ; RAMOS, C.C.F. **Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral .** Rev Bras. Otorrinol, v.71, n.2, p.181-187, mar/abr, 2005.

CRUZ, I. B. F. et al. **Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas.** Oral Oncology, European Journal of Cancer, Oxford, v. 32B, n.1, p.55-62, Jan. 1996.

D`COSTA, J. et al. **Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India.** Oral Oncol, Oxford, v. 34, p. 413-420, 1988.

DE VILLIERS, E. M. **Human Pathogenic Papillomavirus Types: an update.** Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186: 1-12.

GASCO, M.; CROOK, T. **The p53 network in head and neck cancer.** Oral Oncol 2003; 39: 222-31.

GILLISON, M. L. et al. **Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers.** JNCI 2000; 92(9): 709-20.

GIOVANNELLI, L. et al., **Human Papillomavirus DNA in oral mucosal lesions.** J Infect Dis, Chicago, v. 185, p. 833-836, 2002.

GIRALDO, C. P. et al. **Avaliação Citológica da Orofaringe de Mulheres portadoras de HPV genital.** Rev Bras Ginecol Obstet 1996 out; 18(9):737-42.

GRAVITT, P. E. **Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses.** J of Clinical Microbiology 2000; 357-61.

HANSSON, B.G. et al., **Strong association between infection with human papillomavirus and oral oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden.** Acta Otolaryngologica, Stockholm, v. 125, n. 12, p. 1337-1783, Dec. 2005.

HERRERO, R. et al., **Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis.** Clinical otolaryngology and allied sciences, Oxford, v. 31, n.4, p. 259-266, Aug. 2006.

HOFFMANN, M. et al. **Prevalence of Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck determined by Polymerase reaction and**

Southern Blot Hybridization: Proposal for Optimized Diagnostic Requirements.

Acta Otolaryngol (Stockh) 1998; 118: 138-44.

KADEMANI, D. et al. **Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: The influence of histologic grade.** J Oral Maxillofac Surg, v.63, p. 1599-1605, 2005.

KOJIMA, A. et al. **Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas.** Oral Oncology, Oxford, v. 38, n. 6, p. 591-596, Sep. 2002.

LANCELLOTTI, C. L. P. et al. **Diagnóstico laboratorial. In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1a edição, São Paulo: BG Cultural; 2000. 4: 45-60.**

LYPE, E. M. et al. **Oral cancer among patients under the age of 35 years.** J Postgrad Med 2001; 47(3):171-6.

MILLER, C.S. et al. **Human papillomavirus in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of the literature.** Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; 82(1): 57-68.

MILLER, C. S.; JOHNSTONE B. M. **Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontics, v.91, n.6, p.622-635, june. 2001.

MILLON, R.R. et al. Oral cavity. In: Millon RR, Cassisi NJ, eds. **Management of head and neck cancer.** 2nd ed., Philadelphia; 1994, p.321-39.

MORK, J. Et al. **Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck.** N Engl J Med 2001; 344(15): 1125-31.

NAGPAL, J.K.; DAS, B.R. **Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future direct ions for its effective management .** Oral Oncol, v.39, p.213-221, 2003.

NEVILLE B.W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial.** 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1998. 705p.

NEVILLE, B.W. et al. Patologia epitelial. In . **Patologia Oral & Maxilofacial.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.10, p. 303- 372.

OKADA, M. M. K. et al. **Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV)**. In: **Carvalho JJM, Oyakawa N.** I Consenso Brasileiro do HPV. 1ª edição. São Paulo: BG Cultural; 2000. p.1-6.

OLIVEIRA, M.C. et al. **HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica**. Rev Bras Otorrinolaringol 2003 jul/ago; 69(4): 553-9.

OLIVEIRA, M.C. **Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco e sua relação com a expressão das proteínas p53 e bcl -2 em carcinomas epidermóides orais**. 2005.105f. Tese (Doutorado) Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

PREMOLI-DE-PERCOCO, G.; CHRISTENSEN, R. **Human Papillomavirus in Oral Verrucal-Papillary Lesions**. Pathologica 1992; 84: 383-92.

PREMOLI-DE-PERCOCO, G. et al. **Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology: an in situ hybridization study**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 86(1): 77-81.

PINÊRA, K. et al. **Determinação do teor alcoólico de anti-sépticos bucais e carcinogênese bucal química**. Rev Bras Ciênc Estomatol 1996; 1: 13-7.

PONTES, I.M. **Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos**. 2003. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal do Amazonas. Universidade Federal de São Carlos.

REGEZI, J. A; SCIUBBA, J. J. Condições ulcerativas. In: **Patologia bucal: cor relações clinicopatológicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 2, p. 27-75.

REMMERBACH, T.W. et al., **PCR detection of human Papillomavirus of the muscosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primers sets**. Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 302-308, Aug. 2004.

SARRUF, M.B.J.; DIAS, E.P. **Avaliação Citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV)**. J Bras Doenças Sex Trans 1997; 9(2):4-18.

SCULLY, C. **Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission.** Oral Oncol 2002; 38: 227-34.

SCULLY, C. **Oral câncer: evidence for sexual transmission.** Br Dent Journal , v.199, n.4, p.203-207, aug, 2005.

SILVA, M.S.A.et al. **O papel do HPV na etiologia do câncer de boca.** Rev. ABO Nac, v.12, n.6, p.349-352, dez/ jan. 2005

SMITH, E. et al., **Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers.** International Journal of Cancer, New York, v. 108, p. 766-772, 2004.

SOARES, C.P. et al. **Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral .** Rev Soc Bra Med Trop, v.35, n.5, p.439-444, 2002.

SUGIYAMA, M., **Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics, Saint Louis, v. 95, n. 5, p. 594-600, May, 2003.

SYRJANEN, S. **Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer.** Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v.32S, p.S59-S66, 2005.

TAVARES, R.R. et al. **Condiloma genital em homens e soropositividade para HIV.** DST-J Bras Doenças sexualmente transmissíveis 2000; 12(1):4-27.

TERAI, M. et al. **High prevalence of human papilomavíruses in the normal oral cavity of adults.** Oral Microbiol and Immunology 1999; 14:201-5.

THEREZITA, M.P.G. et al. **Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (hpv) conceitos atuais: revisão bibliográfica.** Rev. Bras. Otorrinolaringol., vol.70, no.4. São Paulo July/Aug. 2004.

UOBE, K. et al . **Detect ion of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by *in situ* PCR.** Oral Oncology, v.37, p.146-152, 2001.

VENTURI , B.R.M. et al . **Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão.** Rev.Bras. Otorrinol, v.70,n.3, p.385-392, mai/jun, 2004.

WATTRE, P. **Apoptose et virus (hormis les retrovirus)**. Revue Française des Laboratoires 1999; 311: 43-9.

ZHANG, Z-Y. et al. **Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa**. International Journal Oral Maxillofacial Surgery, v.33, p.71-74. Feb 2004.

9. ANEXO

9.1 Parecer



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0202.0.115.000-09, intitulado: **“Detecção de polimorfismo no gene E6 do Papiloma Virus Humano (HPV) em carcinoma de células escamosas oral e orofaríngeo”**, tendo como Pesquisadora Responsável Danielle Albuquerque Pires Rocha.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 24 de junho de 2009.

Prof. Dra. Aya Sadahiro
Vice-Coordenadora do CEP/UFAM