

ELIZIÁRIO CESAR DE VASCONCELOS LEITÃO

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS TIPOS MAIS COMUNS DO
VIRUS DO PAPILOMA HUMANO EMBASADO EM ESTUDO CLÍNICO E
EPIDEMIOLÓGICO DAS NEOPLASIAS INCIDENTES DE CAVIDADE BUCAL
E OROFARINGE NO DISTRITO FEDERAL**

Brasília - DF, 2011

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ELIZIÁRIO CESAR DE VASCONCELOS LEITÃO

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS TIPOS MAIS COMUNS DO
VIRUS DO PAPILOMA HUMANO EMBASADO EM ESTUDO CLÍNICO E
EPIDEMIOLÓGICO DAS NEOPLASIAS INCIDENTES DE CAVIDADE BUCAL
E OROFARINGE NO DISTRITO FEDERAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Luis Isamu Barros Kanzaki

Brasília – DF, 2011

ELIZIÁRIO CESAR DE VASCONCELOS LEITÃO

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS TIPOS MAIS COMUNS DO
VIRUS DO PAPILOMA HUMANO EMBASADO EM ESTUDO CLÍNICO E
EPIDEMIOLÓGICO DAS NEOPLASIAS INCIDENTES DE CAVIDADE BUCAL
E OROFARINGE NO DISTRITO FEDERAL**

Dissertação ou Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre ou Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Luis Isamu Barros Kanzaki – PRESIDENTE

Universidade de Brasília

Melaine de Almeida Lawall

Universidade Católica de Brasília

João Geraldo Bugarin Junior

Universidade Paulista

Dedico este trabalho ao meu pai, in memoriam, Deusdedit de Vasconcelos Leitão por ter sempre ter acreditado em mim. A minha mãe Maria José Cesar de Vasconcelos por todo seu amor, dedicação e incentivo durante toda minha existência.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, meu Pai de infinita bondade, por me abençoar com a minha vida, e com minha fé. Deu-me uma família que amo e que é base de tudo que sou. Deu-me saúde, capacidade e oportunidade para chegar até aqui.

Agradeço a minha esposa Soyama Brasileiro pelo seu amor e dedicação. Obrigado por todos esses anos, sempre me apoiando e acreditando em tudo que me proponho a fazer. Você é especial e é por isso e por tudo que já passamos que divido com você este trabalho.

Aos meus filhos Mateus, Lucas e Marina pelo afeto e compreensão.

Aos meus irmãos e irmãs consanguíneos pela torcida a distância ao meu sucesso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Kanzaki, pela concretização deste sonho, pela compreensão e paciência com este neófito na área acadêmica. Juntos, superamos os obstáculos.

Ao professor Joaquim e Dr.^a Izabel pelo incentivo inicial, abrindo portas para o início deste trabalho, criando expectativas, bem como pelo apoio operacional durante a pesquisa.

A toda equipe da Anatomia Patológica do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), em especial ao Dr. Geraldo, Dr.^a Sioeme, Dr. Carlos Henrique, Lúcia e Marta, bem como a todos os membros desta unidade que tanto respeito têm por mim e pelo meu trabalho.

A todos os membros da Coordenação do Programa do Controle do Câncer e Tabagismo no DF, em especial ao Dr. Celso Antonio Rodrigues pelo incentivo e apoio ao meu trabalho e à minha pesquisa com câncer bucal.

A todos os meus colegas da Unidade de Odontologia do HRAN, em especial à coordenadora dessa unidade, a amiga Dr.^a Jussara Campos.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção na UnB, Élida e Yoji

Ao Laboratório Biomol Tecnologia em Captura Híbrida, com agradecimento especial à Dr.^a Renata, que muito me auxiliou nos exames moleculares.

Ao Dr. João Eudes pela orientação nos ensaios moleculares da Captura Híbrida.

À Professora Izabel pela orientação nas amostras estatísticas.

*“Lembra-te de que falando ou silenciando, sempre é possível fazer
algum bem”
(Chico Xavier)*

RESUMO

O câncer bucal é uma das neoplasias malignas mais comuns nas regiões de cabeça e pescoço, responsável por elevada incidência na população e altas taxas de óbito. A exposição aos produtos do fumo e álcool tem sido considerada a maior causa de seu desenvolvimento. Todavia, algumas evidências apontam para o fato de que o Vírus do Papiloma Humano (HPV) possa participar em sua gênese e progressão. O objetivo principal deste trabalho é a investigação da presença de sequências gênicas dos tipos circulantes do HPV em lesões escamosas que ocorrem na cavidade bucal, embasada em estudo clínico e epidemiológico das neoplasias incidentes. Amostras de 26 pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Regional da Asa Norte, selecionados por apresentarem lesões clinicamente suspeitas de malignidade, foram biopsiadas com finalidade diagnóstica comparativa. Aplicou-se formulário próprio para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. Os resultados mostraram que dos 26 pacientes estudados, 21 deles (84,61%) tiveram o diagnóstico de carcinoma epidermóide, dos quais 15 apresentaram o de cavidade bucal (71%) e 6, o de orofaringe (29%). Entre os pacientes estudados, predominou o gênero masculino, 69,2%, preponderando a ancestralidade caucásica, 57,7%, seguido de mestiços com 38,5% e de origem negra africana com 3,8%. A faixa etária predominante foi de 60-69 anos com 34,6%, seguida da de 70-79 anos com 19,2%. Dos pacientes da amostra, 80,8% declararam ser tabagistas crônicos e 65,4%, etilistas crônicos. Em nenhum dos 26 pacientes da amostra, detectaram-se sequências gênicas dos tipos mais frequentes de HPV investigados nos tecidos biopsiados através do emprego da hibridação do ácido nucléico do HPV pela técnica da captura híbrida 2 da Qiagen.

Palavras-chave: captura híbrida; câncer oral; vírus do papiloma humano

ABSTRACT

The oral cancer is one of the most common malignant neoplasia of head and neck, exhibiting high incidence in the general population, accounting for high rates of death. Exposure to tobacco smoking products and alcohol ingestion have been considered the major cause of oral cancer development. Besides, some scientific reports point out to the possible involvement and co-participation of the Human Papillomavirus in the etiology and progression of oral cancer. The main objective of this research work was to investigate the presence of genic sequences of circulating HPV types in squamous lesions that happen to occur in the oral cavity based on clinical and epidemiological studies of incident neoplasias. Samples of 26 patients attended in the Stomatology Service of the Hospital Regional da Asa Norte, Brasília, were selected as they presented clinical lesions suspected of câncer and had the lesions surgically removed for histopathological and molecular analysis and for diagnostic purposes. Appropriate forms were applied to collect clinical and epidemiological data. In order to investigate the presence of distinct types of HPV in the tissues removed, the HPV DNA virus hybrid capture assay was employed (Qiagen). The results showed that of 26 patients studied, 80.76% (21) had the histopathological diagnostic of carcinoma epidermoid , which 71% in the oral cavity (15) and 29% the oropharynx (06). Of all patients enrolled in the study, male gender predominate, 69,2%, and prevailed the caucasian ancestry, 57,7%, followed by the mixed racial representatives compounding 38,5% and of african ancestry of 3,8%. Relating to the age distribution, the 60-69 years old group predominated accounting for 34,6%, followed by the 70-79 years old group representing 19,2% of them. Chronic tabagists were represented by 80.8% and alcohol chronic consumer by 65.4% of all patients. None of the patients had HPV DNA segment detected by the assay previously mentioned.

Keywords: Hybrid capture; oral cancer; human papillomavirus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura – 1 Ciclo infeccioso do HPV	21
Figura 2 – Estrutura genômica do HPV 16. Região precoce (Early), região tardia (Late) e a LCR (Long Control Region) que corresponde à região regulatória . www.territorioscuola.com	22
Figura 3 – HPV em microscopia eletrônica. www.territorioscuola.com	23
Figura 4 – Esquema da técnica de captura do híbrido (Carestiato, 2004)	36
Figura 5 – Carcinoma epidermóide de língua úlcero-infiltrativa.....	44
Figura 6 – Carcinoma epidermóide de assoalho bucal úlcero-vegetante.....	44
Figura 7 – Carcinoma epidermóide de assoalho bucal úlcero-infiltrativo	45
Figura 8 – Carcinoma epidermóide de língua úlcero-vegetante.....	45
Figura 9 – Carcinoma epidermóide bem diferenciado.....	46
Figura 10 – Carcinoma epidermóide bem diferenciado.....	47
Figura 11 – Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	47
Figura 12 – Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado.....	48
Figura 13 – Imagem tumoral indicativo da presença de coilócito.....	48
Figura 14 – Imagem tumoral não conclusivo para coilócito.....	49
Figura 15 – Imagens Carcinoma epidermóide <i>in situ</i>	49
Figura 16 – Paciente 01, passagem 11, 31/05/11 (100x)	50
Figura 17 – Paciente 01, passagem 10, 04/05/11 (100x)	50
Figura 18 – Paciente 01, passagem 12, 05/07/11 (400x)	51
Figura 19 – Paciente 01, passagem 12, 05/07/2011(400x)	51
Figura 20 – Paciente 02, passagem 08, 16/06/2011	52
Figura 21 – Paciente 03, passagem 08, 04/05/2011	52
Figura 22 – Resultados da captura híbrida da população do estudo - Tipo A ..	53
Figura 23 – Resultados da captura híbrida da população em estudo - Tipo B .	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios da classificação histológica dos carcinomas de células escamosas por Barnes <i>et al.</i>	33
Tabela 2 – Características sociodemográficas da população do estudo	38
Tabela 3 - Quadro demonstrativo do consumo e frequência do etilismo da população em estudo	39
Tabela 4 – Intervalo de idade referente ao etilismo	39
Tabela 5 – Quadro demonstrativo do consumo e frequência do tabagismo da população em estudo	40
Tabela 6 – Intervalo de idade referente ao tabagismo.....	40
Tabela 7 – Localização geográfica e frequência das lesões da população em estudo	40
Tabela 8 – Diagnóstico conclusivo e frequência das amostras da população estudada	41
Tabela 9 – Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) com relação ao diagnóstico conclusivo e a variável estadiamento tumoral	41
Tabela 10 – Teste exato de Fisher. Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,01$) com relação à cor da lesão e à variável estadiamento tumor.....	42
Tabela 11 – Teste Exato de Fisher. Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) com relação ao etilismo e à variável estadiamento tumoral	42
Tabela 12 – Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) com relação ao tabagismo e à variável estadiamento tumor	43
Tabela 13 – Tabela relacionada aos exames clínicos da população da amostra estudada	43
Tabela 14 – Quadro demonstrativo da idade e diagnóstico conclusivo	46
Tabela 15 – Variabilidade dos achados do HPV na carcinogênese das neoplasias de cabeça e pescoço	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Câncer	16
2.2 Câncer de cavidade bucal e orofaringe	16
2.2.1 Etiologia	18
2.2.1.1 Agentes Químicos.....	19
2.2.1.2 Agentes Físicos	19
2.2.1.3 Agentes Biológicos	20
2.2.1.3.1 Vírus do Papiloma Humano	20
2.2.2 Hibridação	26
2.2.3 Manifestações Clínicas	27
2.2.4 Características Histopatológicas	28
2.2.5 Características Citopatológicas	29
3 OBJETIVO.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MÉTODOS	31
4.1 Pacientes	31
4.2 Critério de inclusão	31
4.3 Critérios de Exclusão	31
4.4 Exame físico intra-bucal de partes moles	32
4.5 Biópsia e análise histopatológica.....	32
4.7.1 Amostras clínicas	34
4.7.2 Captura híbrida para HPV	35
4.8 Análise Estatística.....	36

5 RESULTADO	38
5.1 Caracterização da análise estatística	38
5.2 Análises de resultados	43
5.2.1 Resultados dos exames clínicos	43
5.2.2 Resultados exames histopatológicos	46
5.2.3 Resultados do cultivo de células	49
5.2.4 Resultados dos exames moleculares	52
6 DISCUSSÃO	55
6.1 Considerações gerais	55
6.2 HPV e câncer bucal e de orofaringe	56
6.3 Interpretação epidemiológica, clínica e histopatológica	58
6.4 Interpretação do cultivo de células	60
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide bucal (CEB) é uma das neoplasias malignas mais comuns nas regiões de cabeça e pescoço, perfazendo 90% dos tumores malignos que acometem os tecidos bucais. Está situado entre as 10 neoplasias que mais frequentemente acometem homens e mulheres no mundo, estando entre os seis tipos mais diagnosticados e entre as 20 maiores causas de morte na população brasileira (01).

Entre as neoplasias, segundo estimativas de incidência feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2008, o câncer bucal é considerado o sétimo mais frequente. Para o ano 2010, são estimados 489.270 novos casos de câncer em nosso país, dos quais 14.120 acometerão a cavidade bucal; 10.330 atingindo o gênero masculino e 3.790, o feminino. No Centro-Oeste há estimativa de 540 neoplasias primárias em homens e 230 em mulheres, com média de 7,83 e 3,28 por cada 100.000 habitantes, respectivamente. No Distrito Federal há estimativa de 110 casos primários em homens e 40, em mulheres, com taxa bruta de 8,20 e 3,10, respectivamente (01).

No Brasil, as neoplasias são consideradas a segunda causa de morte por doença, sobrepujadas somente pelas doenças cardiovasculares, que correspondem a 32,6% (02).

Anualmente são diagnosticadas cerca de 6,4 milhões de neoplasias malignas no mundo. O câncer bucal é responsável por 10% desses casos (01). As taxas de incidência do carcinoma escamoso oral variam de um país para o outro, podendo ocorrer variações nas diferentes regiões de um mesmo país. As variações se devem não somente às diferenças existentes nos hábitos populacionais, como também às ações de prevenção e controle do câncer, às formas de tratamento e à assistência terapêutica. O carcinoma escamoso oral (CEO) é o tipo histológico de câncer mais comum de cabeça e pescoço no mundo; a sexta causa de malignidade geral e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, com cerca de 300.000 novos casos registrados a cada ano (03, 04).

Tem sido reportado aumento na incidência do Carcinoma Espinocelular Bucal (CECB) em indivíduos mais jovens (com menos de 45 anos) e em mulheres, alterando o perfil epidemiológico desta lesão (05-06). Todavia, estes dados variam de acordo com a região geográfica estudada. A incidência mais alta no gênero masculino foi observada em Somme, França; e a mais alta, no feminino, foi constatada em Bangalore, Índia (07). A idade média para diagnóstico da neoplasia é ainda em indivíduos mais velhos com 63 anos (08).

Sundefeld (09) observou, em seu estudo, que cerca de 12% dos pacientes que apresentavam Carcinoma Espinocelular Bucal (CECB), não fumavam e 18% não consumiam bebida alcoólica. Dahlstrom *et al.* (10), em estudo epidemiológico prospectivo com 172 pacientes que nunca fumaram ou ingeriram álcool e com 1.131 pacientes que fumaram e beberam, observaram que o primeiro grupo era preferencialmente composto por mulheres e que estas apresentaram proporção mais elevada de câncer da cavidade bucal e da orofaringe. Tais observações sugeriram que, além dos fatores clássicos, outros poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento da neoplasia. Entre os outros fatores relacionados com o CECB, estão as imunodepressões, os componentes da dieta, as infecções fúngicas e, conforme apontam algumas pesquisas, a infecção por determinados agentes virais, em particular o HPV (11-13).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é denominação usada para doenças em que células se dividem sem controle tornando-se aptas para invadir outros tecidos. Células cancerosas espalham-se por outras partes do corpo através do sistema sanguíneo ou linfático (04).

A oncogênese é constituída de inúmeros processos complexos, que envolvem o acúmulo de mutações no DNA da célula do hospedeiro. Essas mutações levam a alterações na expressão ou função de genes-chave, proto-oncogenes e genes supressores de tumor, para a manutenção da homeostasia celular. Falha na expressão desses genes acarreta crescimento celular desordenado. As células malignas são identificadas por ausência de respostas a impulsos que regulam o crescimento, induzem a diferenciação e suprimem a sua proliferação (14).

Indubitavelmente o câncer é um problema de saúde pública no Brasil. Nas últimas décadas, o registro brasileiro de câncer tem demonstrado um aumento no número de novos casos, ressaltando a importância da doença e seu impacto socioeconômico. Entre os principais fatores associados ao maior número de casos estão a urbanização e a industrialização. A concentração de quase 70% da população em grandes centros favorece a exposição aos fatores de risco ambientais, aos quais são atribuídos relação direta ou indireta com 80% dos casos de câncer (15).

2.2 CÂNCER DE CAVIDADE BUCAL E OROFARINGE

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais prevalente na cavidade oral, correspondendo a mais de 90% de todas as malignidades aí localizadas (16,17). Seu potencial de agressividade está relacionado a diversos

fatores, sendo considerados mais significativos o grau histológico da malignidade, tamanho da lesão, grau de comprometimento dos tecidos vizinhos, presença de metástase no momento do diagnóstico e localização anatômica da massa neoplásica (17).

Apesar dos grandes avanços e descobertas, o prognóstico desse tipo de câncer é muito pobre, com taxa de sobrevida de 56% em cinco anos (18).

O conhecimento objetivo sobre o dano causado pelo câncer à população, a existência de fatores de risco determinados, bem como de procedimentos de prevenção e tratamento eficazes para a doença, colocam o câncer bucal como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Diante desta perspectiva, o que chama atenção é o padrão de diagnóstico encontrado para o câncer bucal que, em geral, é tardio. Mais de 50% dessas lesões são identificadas em estágios III e IV, cujos prognósticos alcançam taxas de sobrevida inferiores a 40%, associadas a tratamentos mutilantes e de alto custo. A propósito, a falta de diagnóstico precoce pelo profissional e o desconhecimento dos principais fatores de risco e sinais de alerta pela população têm contribuído de forma decisiva para o pobre prognóstico da doença (01).

De acordo com a Classificação Internacional das Doenças (International Classification of Diseases, Tenth Revision [ICD-10]), o câncer bucal refere-se a subgrupo de alterações malignas da cabeça e do pescoço que se desenvolvem nos lábios, língua, glândulas salivares, gengiva, assoalho da boca, orofaringe, superfícies bucais e outras localizações intrabucais. Todavia, o termo tem sido utilizado como sinônimo de carcinoma espinocelular (CEC) de origem na mucosa bucal, representando cerca de 90-95% de todas as alterações presentes nos sítios anteriormente mencionados. A Organização Mundial da Saúde apresenta o CEC como o 6º câncer mais prevalente no mundo, com incidência bastante variável nas diferentes regiões, apresentando a maior prevalência no sudeste asiático e na Índia. (01,19, 20).

O carcinoma epidermóide bucal, também chamado de carcinoma de células escamosas oral, atinge mais homens do que mulheres, atualmente, porém, a proporção sexo masculino: feminino tem declinado, sendo esta de aproximadamente 2:1 (21). Cerca de 75% dos casos ocorre na faixa etária dos

60 anos e os principais sítios anatômicos de acometimento são a língua e o lábio inferior (22).

Os países com alto risco para essas neoplasias são a França, na região do baixo Reno, a Hungria, a Índia, o Brasil e a China, principalmente em Hong Kong (18,23-25). Na Tailândia, aproximadamente 30% dos casos aparecem na orofaringe.

A Índia tem quase 56.000 novos casos por ano, sendo provavelmente uma das incidências mais altas do mundo (26). Estudos têm mostrado que na Inglaterra e no País de Gales houve aumento da incidência em pacientes jovens nas últimas três décadas do século passado (05). Em São Paulo parece haver aumento da proporção de casos de câncer em mulheres idosas, quando comparadas àquelas na primeira e segunda idades (27, 28).

2.2.1 Etiologia

A etiologia do câncer está relacionada à interação entre fatores endógenos, como os genéticos, e ambientais. Entre os fatores ambientais, destacam-se a exposição à radiação, o uso de tabaco, a ingestão de álcool, a obesidade, o sedentarismo e o consumo de nitritos e nitratos (28,29). Por sua vez, a prevenção baseia-se na adoção de hábitos saudáveis de vida, com a prática regular de exercícios e alimentação saudável, rica em fibras, vegetais e frutas (30).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) (30), um terço da incidência mundial de câncer poderia ser prevenida, porém, sabe-se que apenas pequena parcela de fumantes e usuários de álcool desenvolvem câncer oral, sugerindo a presença de co-fatores que podem incluir o papilomavírus humano (HPV) ou ainda outros agentes infecciosos. Dieta precária em certos nutrientes e alguns aspectos da higiene oral são descritos como prováveis co-fatores (12). Além disso, a relevância das exposições ocupacionais na etiologia do câncer de cavidade oral vem sendo cada vez mais estudada, apesar de ainda não estar claramente estabelecida.

2.2.1.1 Agentes Químicos

O tabaco, atualmente, é considerado o mais importante fator de risco para o câncer oral, principalmente o câncer de orofaringe, havendo clara relação entre o aumento do risco de câncer, o número de cigarros fumados por dia e o tempo de exposição (11). Os compostos químicos encontrados no tabaco contribuem, de maneira inquestionável, para o desenvolvimento de alterações celulares que podem resultar em neoplasias. Entre os principais agentes cancerígenos, destaca-se o benzopireno, que por conversão metabólica gera o composto diol epóxido, um potente mutagênico, com capacidade de intercalar-se no esqueleto do ácido desoxirribonucléico (DNA) (31). De acordo com Franco *et al.* (32), o risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos que fumam cigarros industrializados é 6,3 vezes maior do que em não fumantes.

O álcool é considerado o segundo fator de risco, sendo de aproximadamente 90% a contribuição sinérgica entre o tabaco e o álcool na etiopatogenia do câncer (12). Também com relação ao uso do álcool, o aumento do risco de câncer está fortemente relacionado com o aumento do número de doses e da frequência (11, 12). Há três alvos moleculares que podem sofrer com o efeito do álcool: as proteínas, os lipídeos e o DNA. As substâncias resultantes da ação do álcool sobre as proteínas e os lipídeos vão lesar o DNA, que também pode ser danificado pelo efeito direto do álcool sobre o mesmo, resultando em mutações que podem levar à proliferação desordenada das células (23). Na célula, o álcool parece induzir alterações inflamatórias e bioquímicas que atuam de forma sinérgica para lesá-la (33).

2.2.1.2 Agentes Físicos

Os raios solares têm correlação significativa com as lesões malignas do vermelhão dos lábios, as quais apresentam comportamento clínico semelhante aos carcinomas de pele e por isso tem menor índice de metástase. O CEC é o

mais frequente de todos os cânceres de lábio e a localização preferencial é o lábio inferior com 88 a 98% dos casos (32).

2.1.1.3 Agentes Biológicos

2.2.1.3.1 Vírus do Papiloma Humano

Entre 1974 e 1976 segundo Harald zur Hausen (34), pesquisadores começaram a postular e analisar um possível papel do HPV no câncer de colo uterino. Em 1976, Meisels e Fortin publicaram 2 relatórios afirmando que o aparecimento de coilócitos em esfregaços do útero indicava a presença de uma infecção por HPV.

Hoje em dia considera-se haver forte associação entre o HPV e as lesões escamosas bucais malignas ou não, principalmente aquelas que acometem a orofaringe, particularmente as tonsilas palatinas e base da língua, e as que aparecem em pacientes que não fumam e não consomem álcool (06, 12, 35). Essas neoplasias relacionadas ao HPV apresentam frequentemente morfologia basalóide, sendo a mutação do p53 menos frequente entre elas (06).

Entre os primeiros trabalhos relacionando o HPV com o câncer bucal há o de Syrjänen, que em 1983, analisando pelo método de imunohistoquímica 40 biópsias de pacientes com carcinoma escamoso oral, detectou a presença do antígeno viral em 40% delas. A partir daí, vários outros trabalhos têm sido publicados, mostrando íntima associação entre o HPV e o câncer bucal e da orofaringe (12, 36, 37).

Neoplasmas com estágio clínico III e IV têm maior carga viral do que aqueles nos estádios entre zero e I (12).

Admite-se que a transmissão do vírus para a cavidade oral possa ocorrer das seguintes formas: contacto sexual, a partir de verrugas de pele em uma mesma pessoa ou por via materno-fetal. A via materno-fetal pode ser através da placenta, por contaminação do líquido amniótico ou pelas secreções

vaginais no canal do parto (38, 39).

O vírus pode penetrar na mucosa do hospedeiro através de microlesões, apresentando período de incubação variável (37, 40, 41). A infecção viral inicia-se quando o virion atinge e penetra as células basais do epitélio, em células indiferenciadas e/ou em divisão. Uma vez ocorrida a internalização na célula hospedeira, a replicação acontece exclusivamente no núcleo celular. Os mecanismos da invasão viral na célula hospedeira (Figura 1), ainda que não totalmente elucidados, estão relacionados com as integrinas (42, 43).

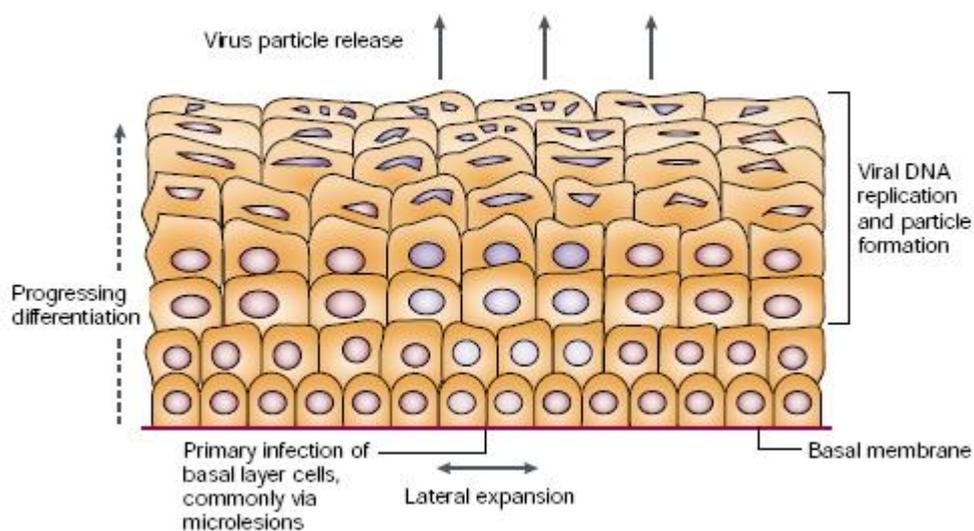


Figura – 1 Ciclo infeccioso do HPV

Para que a infecção seja produtiva, o vírus precisa infectar células da camada basal do epitélio. Isso normalmente ocorre através de microlesões, na pele ou na mucosa. As células infectadas se dividem e se espalham lateralmente. Algumas dessas células progenitoras entram no programa de diferenciação e migram para as camadas suprabasais, onde genes virais serão ativados, o DNA do vírus será replicado e as proteínas do capsídeo serão expressas. As partículas virais brotam da célula e são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (34).

Na cavidade bucal, as tonsilas palatinas são consideradas o principal local para a infecção pelo HPV, onde o íntimo contato do epitélio das criptas com o tecido linfóide na profundidade das mesmas facilita a penetração e disseminação do vírus (12, 36).

O HPV é epiteliotrópico, cuja partícula viral mede cerca de 55 nm, sem

envelope, com capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros e genoma circular de DNA de fita dupla, com aproximadamente 7500-8000 pares de bases. Seu genoma pode ser dividido em três regiões principais: a controladora (LCR), a precoce (E) e a tardia (L). A região controladora está relacionada com a origem de replicação e com os elementos que regulam a expressão gênica dos HPVs. A região precoce codifica proteínas funcionais envolvidas no controle da transcrição, na replicação e no potencial carcinogênico do vírus. As proteínas E6 e E7 atuam na imortalização e transformação celular, que são sempre expressas em neoplasias malignas de cérvix uterina. A região tardia codifica as proteínas estruturais L1 e L2 (Figura 2), componentes do capsídeo viral (43-47).

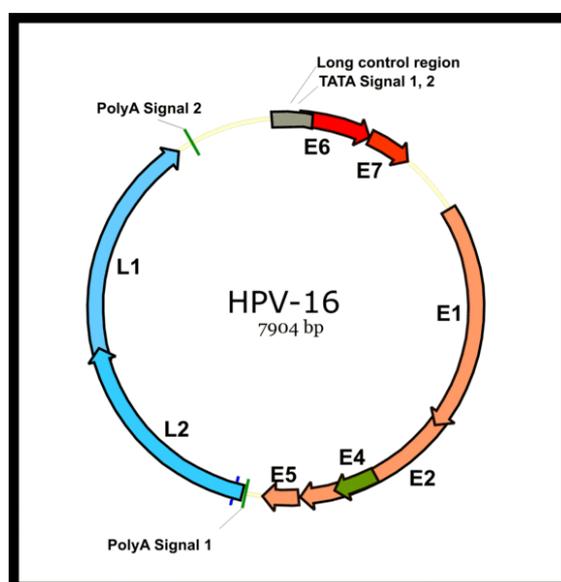


Figura 2 – Estrutura genômica do HPV 16. Região precoce (Early), região tardia (Late) e a LCR (Long Control Region) que corresponde à região regulatória . www.territorioscuola.com

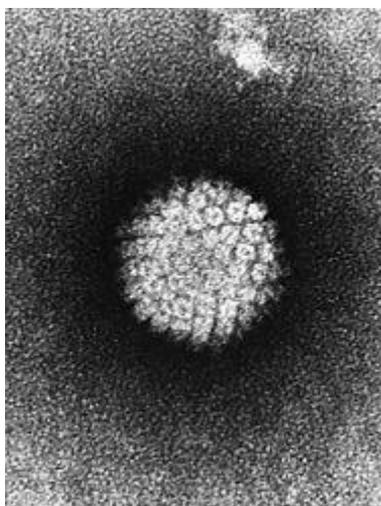


Figura 3 – HPV em microscopia eletrônica. www.territorioscuola.com

A proteína E6 constitui-se de cerca de 150 aminoácidos. É capaz de induzir importantes modificações na célula hospedeira, apresentando efeito anti-apoptótico. Sua ação se faz pela degradação das proteínas pró-apoptóticas Bak e p53. A proteína E6 associa-se à proteína celular E6-AP (E6-associated protein), que por sua vez vincula-se à p53, inibindo sua atividade e levando a sua degradação pela via da ubiquitina. A proteína p53 atua regulando negativamente o crescimento celular, porém, na presença de E6, a sua resposta ao dano do DNA fica impedida, não induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 ou a apoptose como normalmente aconteceria (48-50).

A proteína E7 apresenta 98 aminoácidos e também está associada às transformações na célula hospedeira, atuando principalmente pela ligação com a proteína retinoblastoma (pRb). A pRb é uma proteína supressora tumoral que atua impedindo a progressão do ciclo celular no ponto de controle G1/S. Essa capacidade estaria impedida na presença da proteína viral E7. A desestabilização da pRb por ação da E7 permite a liberação de E2F do complexo pRb/E2F. Isso permite que o E2F, um regulador da transcrição de genes associados à proliferação celular, transative os genes relacionados com a fase S do ciclo celular. Assim, E6 e E7 são capazes de immortalizar queratinócitos e induzir a síntese de DNA em células quiescentes. Todavia, somente a ação destas duas proteínas é insuficiente para o desenvolvimento de fenótipo maligno (33, 48-50).

A possibilidade de existir relação entre o estabelecimento do CECB e a infecção por HPV foi relatada inicialmente por Syrjänen e colaboradores (51,52), e continua sendo alvo de inúmeros estudos. Muitas lesões bucais mostram que fatores combinados, incluindo a presença de HPV, aumentam o risco de transformação maligna celular (51, 53).

Atualmente, são conhecidos mais de 200 tipos de HPV (Figura 3) e provavelmente muitos ainda estão por serem evidenciados (48, 49, 54-56).

Nos estudos de Syrjänen *et al.* (57-60) observou-se que a infecção por HPV poderia determinar alterações malignas nas células epiteliais da mucosa bucal. Syrjänen *et al.* (58) observaram que, das 40 amostras parafinadas de

CECB analisadas por microscopia óptica para verificar possíveis características histológicas de infecção por HPV, 14 delas (35%) mostravam a presença de coilócitos. Utilizando a técnica da imuno-histoquímica, os autores sugeriram que a presença do HPV poderia ser o fator responsável por lesões como o papiloma de células escamosas, a hiperplasia focal e o condiloma acuminado, também podendo estar envolvido na etiologia do câncer bucal.

Segundo Cox, Scully e Maitland (13), existe evidência de que ocorra deleção na região tardia do genoma do HPV 16. Isso não é comum, uma vez que os genes tardios do HPV 16 codificam proteínas estruturais envolvidas na montagem da nova partícula viral e no reconhecimento de receptores de superfície da célula hospedeira. É possível que essa deleção dos genes tardios nas cepas virais de epitélio bucal permita interações específicas entre as proteínas do capsídeo viral e os receptores do epitélio bucal (52,60).

As lesões bucais associadas com o HPV podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com seu comportamento biológico: lesões benignas e lesões pré-malignas ou malignas. As lesões bucais benignas incluem o papiloma de células escamosas, a verruga vulgar, o condiloma acuminado e a hiperplasia focal epitelial. Está bem documentada na literatura, a clara associação dessas lesões com o HPV. Os principais tipos já identificados nas alterações benignas, pré-malignas ou malignas são os tipos 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 e 57. Sete deles (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35) foram isolados de mucosa normal (56-59, 61, 62).

Entre os tipos de HPV conhecidos, alguns são classificados como “HPV de alto risco” (HR-HPV, high risk HPV) ou oncogênicos, devido à sua frequente associação com processos neoplásicos malignos, dos quais os principais representantes são os tipos 16, 18, 31, 33 e 35. Os HR-HPVs foram detectados em mais de 90% das lesões de carcinoma epidermóide do colo uterino, estando bem estabelecida sua associação com a presença de tumores malignos nesse tecido (50, 63-65).

Estudo brasileiro realizado por Vidal *et al.* (66,67), em 40 amostras de carcinoma bucal coletadas por citologia esfoliativa, utilizando a captura híbrida (Digene), obtiveram-se resultados com a presença de HPV de baixo e alto risco em 22,5% (n=9) das amostras.

Estudo de Smith *et al.* (5) buscou determinar se existiam diferenças

significativas entre fatores de risco e características do tumor em casos de CECB HPV-positivo e negativo. A prevalência de HPV de alto risco foi de 20% nos casos de CECB. Três tipos de HPV foram identificados: 16 (87%), 18 (3%) e 33 (11%). Os fatores de risco para o HPV de alto risco foram: idade jovem com mais parceiros sexuais e a prática de sexo orogenital ou oroanal. Quanto às características do neoplasma, as amostras de CECB com HR-HPV apresentaram citologia esfoliativa positiva para HR-HPV, estágios mais avançados e envolvimento de nódulos linfáticos. De acordo com estudos já citados nesta revisão, o estudo de Smith *et al.* (5) pode concluir que a prevalência do HPV oncogênico é maior em pacientes mais jovens e que está tipicamente associada à transmissão sexual do vírus. Além disso, o estudo levantou a possibilidade da utilização da citologia esfoliativa como importante meio de diagnóstico para os tipos de HPV presentes em cânceres cervicais e de boca.

Meta-análise e revisão sistemática realizada por Hobbs *et al.* (68), buscou esclarecer o papel do HPV na carcinogênese de cabeça e pescoço. Esses pesquisadores reuniram 17 estudos, em que buscaram comparar a presença de HPV em sítios específicos nas neoplasias de cabeça e pescoço (1656 casos de cavidade bucal, 383 de orofaringe, 161 de tonsilas e 412 de laringe). Os resultados permitiram concluir que o HPV era fator de risco para essas malignidades, e que o principal sítio de infecção eram as tonsilas.

Como pode ser observado nesta revisão bibliográfica, ainda existem muitas dúvidas sobre o papel do HPV na carcinogênese bucal, especialmente no CECB. Acredita-se que os resultados, muitas vezes inconsistentes, relacionando o HPV com essa neoplasia possam ser devidos às variações genéticas, em sua etiologia e no envolvimento dos vários tipos de HPV. Ainda, os diferentes estudos acabam por determinar variações nos números da população, nas combinações topográficas e nos métodos utilizados para detecção do DNA viral (69, 48, 12). O sítio do neoplasma tem se mostrado fator relevante.

Os estudos de CEC de cabeça e pescoço têm conseguido estabelecer a associação positiva com o HPV de alto risco, principalmente nos que envolvem a orofaringe, sugerindo fator etiológico distinto para os demais (12, 70, 71).

Para que o diagnóstico histopatológico da infecção por HPV possa ser estabelecido, faz-se necessária a presença de coilocitose, termo introduzido por Koss, Durfee em 1965 (114), considerado sinal patognomônico desta infecção, e que representa efeito celular letal da replicação viral (72).

A coilocitose caracteriza-se pela presença de espaços perinucleares, claros e picnose. Essas anormalidades combinadas com acantose, disceratose e ceratinócitos multinucleares têm sido consideradas evidência microscópica da infecção por HPV (71).

A atipia nuclear pode estar presente em associação como elementos indicativos de infecção pelo HPV como a coilocitose (displasia coilocitótica). Assim, podem ser encontradas desde alterações leves até marcante atipia, em todos os planos do epitélio malpighiano, com acentuado pleomorfismo, perda de polaridade e mitoses anormais, bizarras (72).

2.2.2 Hibridação

Durante os últimos 15 anos, o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologias que envolvem os ácidos nucleicos. São várias as tecnologias utilizadas para a detecção do HPV, às quais incluem os imunoenaios e os testes moleculares. As técnicas moleculares promovem contribuição para o diagnóstico de patologias substituindo os métodos indiretos de detecção (pesquisa de anticorpos específicos) ou diretos como o cultivo e isolamento de microorganismos, (que apresentam baixa sensibilidade e longos períodos para sua proliferação *in vitro*) (73).

O método de hibridação direta baseia-se em pareamento complementar de sonda marcada para o ácido nucleico de HPV. Sondas biotinizadas podem ser detectadas com substratos cromogênicos de rotina e o método pode ser automatizado para uso clínico. Melhoras na sensibilidade técnica têm sido feitas por amplificação do sinal, uso de sondas fluorescentes, protocolos mais rigorosos, uso de nanosondas e combinações de técnicas diferentes. Uma vantagem da hibridação direta é que a infecção pelo HPV pode ser identificada em células específicas (células neoplásicas versus células normais) e o seu

estado físico (epissomal ou integrado) também pode ser determinado. Se o método for suficientemente sensível, o número de cópias do HPV integrado também pode ser estimado (73).

O teste por captura híbrida é designado para detectar 18 tipos de HPV divididos em grupos de alto risco, tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68; e baixo risco, tipos 6, 11, 42, 43 e 44 (10, 15). Este método é baseado na detecção de sequências gênicas do vírus por quimioluminescência (6, 11, 16-18). O material contendo DNA hibrida-se com o coquetel de sonda específico de RNAHPV, assim ocorre a formação de híbridos RNA/DNA, que são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA/DNA. Os híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA/DNA e são detectados por quimioluminescência ultra-sensível. Os valores lidos por um quimioluminômetro são transmitidos a um computador, dotado de software específico, que analisa os valores recebidos e faz os cálculos de validação do ensaio e a quantificação dos controles positivos, negativos e amostras. Os testes de captura híbrida são ao mesmo tempo qualitativos e quantitativos (74-77).

2.2.3 Manifestações Clínicas

O CEB tipicamente apresenta-se como massa, nódulo, ou úlcera de bordas endurecidas, persistente. Mudanças na cor são comuns, podendo apresentar aspecto clínico eritroplásicos ou leucoeritroplásicos (78). A forma clínica mais frequente manifesta-se como lesão ulcerada, de bordas elevadas e endurecidas, com fundo necrótico e granuloso que não cicatriza em período de duas semanas (22).

Pacientes com pequenas lesões orais ou de orofaringe são usualmente assintomáticos ou com sintomas mínimos. Entretanto, com o avanço das lesões, as queixas podem surgir e variar de acordo com o estágio e o local de envolvimento da doença. As mais comuns são dor, odor, disfagia, odinofagia, disfonia, sangramento, perda de peso, dificuldade em abrir a boca e aumento

de volume em linfonodos cervicais. Estágios ainda mais avançados podem apresentar extensas áreas de necrose envolvendo estruturas adjacentes como ossos e músculos, fístula orocutânea, anemia severa e caquexia (79).

O envolvimento de tecidos adjacentes é possível, entretanto, não necessariamente representa invasão local do neoplasma (78). Pode haver destruição do osso subjacente por contiguidade da lesão em mucosa e, quando presente, pode mostrar imagem radiográfica de radiotransparência com margens mal definidas e aspecto semelhante a osteomielite (22).

Os sintomas são incomuns em estágios iniciais, mas se tornam frequentes com a invasão local avançada. Parestesia e dormência na ausência de história de trauma são altamente sugestivas de malignidade invasiva (78).

A disseminação metastática acontece pelas vias linfáticas submandibular, cervical e jugular (78). Um linfonodo que contém depósito metastático de carcinoma apresenta-se endurecido, firme e aumentado. No caso de perfuração da cápsula, o linfonodo parecerá “fixado” ou apresentará pouca mobilidade. Metástases distantes espalham-se mais comumente para os pulmões, fígado e osso, mas qualquer parte do corpo pode ser envolvida (22).

2.2.4 Características Histopatológicas

A maioria dos CECB intra-orais se origina de mucosa não ceratinizada (78). O carcinoma de células escamosas surge do epitélio displásico de superfície e caracteriza-se histopatologicamente por ilhas e/ou cordões invasivos de células epiteliais malignas. Células invasoras podem se estender profundamente no tecido conjuntivo, atingindo o tecido adiposo subjacente, músculos e osso. Estas células podem ainda destruir vasos sanguíneos, invadindo o lúmen de veias ou vasos linfáticos. Frequentemente há intensa resposta inflamatória direcionada ao epitélio invasor e áreas focais de necrose podem estar presentes. O epitélio da lesão é capaz de induzir angiogênese e ocasionalmente desmoplasia. Graus variados de pleomorfismo celular e nuclear são observados e pérolas de ceratina podem ser produzidas no epitélio lesional (22,79,80).

2.2.5 Características Citopatológicas

As alterações celulares mais importantes observadas nas citologias esfoliativas são: anisocitose, vacuolização, propriedade alterada dos corantes, inclusões citoplasmáticas e polimorfismo. Entre as alterações nucleares destacam-se hipercromatismo, hipo ou policromia, irregularidades da membrana, multinucleação, figuras mitóticas aberrantes e alterações degenerativas (81).

As lesões malignas intraorais são caracterizadas por aumento nuclear, variação no tamanho e forma do núcleo, aumento da razão núcleo: citoplasma, nucléolos múltiplos e predominantes, hipercromatismo, anormalidade na cromatina e distribuição e discrepância na maturação das células (82).

Os esfregaços de lesões cancerizáveis e carcinomas orais apresentam as seguintes características: aumento da ceratinização, aumento da área nuclear, alteração da relação núcleo: citoplasma, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo celular, agrupamento da cromatina e irregularidade na distribuição desta (83, 84).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento dos tipos mais comuns do vírus do papiloma humano embasado (HPV) em estudo clínico e epidemiológico das neoplasias incidentes de cavidade oral e orofaringe em pacientes no Distrito Federal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a presença dos diferentes tipos de HPV relacionando-os quando positivo ao aspecto padrão histopatológico de lesões de cavidade oral e orofaringe.

Determinar o perfil epidemiológico e clínico dos pacientes com neoplasias de cavidade bucal e orofaringe no Serviço de Estomatologia do HRAN.

Obter linhas celulares primárias de neoplasias de cavidade bucal e orofaringe para confirmação das análises histopatológicas e moleculares de malignidade das lesões.

4 MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Entre os mais de 1.000 pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Regional da Asa Norte no período de 12 meses, 26 foram selecionados por apresentarem lesões clinicamente suspeitas de malignidade, como as lesões úlcero-infiltrativas ou úlcero-vegetantes, de fundo necrótico, bordas elevadas, bases endurecidas e evolução rápida.

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa responderam a questionário no qual foram coletados dados sobre idade, sexo, profissão, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica, exposição ao sol, opção sexual, lazer, transfusão de sangue e etc.

4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Pacientes portadores de lesões consideradas suspeitas, com as seguintes características:

1. Nódulos tumorais endurecidos, fixos e ulcerados;
2. Lesões clinicamente suspeitas de carcinoma epidermóide cujas características estão descritas anteriormente;
3. Concordância do paciente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Portadores de lesões que não fossem clinicamente suspeitas de

malignidade;

2. Que não estivessem em acompanhamento após tratamento quimioterápico ou radioterápico para o câncer.

4.4 EXAME FÍSICO INTRA-BUCAL DE PARTES MOLES

O exame físico intrabucal de partes moles foi realizado de maneira ordenada, examinando-se cada estrutura anatômica na seguinte ordem: lábios (pele, mucosa e semimucosa), fundo de sulco, mucosa alveolar, gengiva inserida, gengiva livre, rebordo alveolar, mucosa jugal, língua, assoalho bucal, palato duro, palato mole e orofaringe.

Os pacientes foram examinados respeitando-se as normas de biossegurança no consultório odontológico da Unidade de Odontologia do Hospital Regional da Asa Norte com auxílio de luz artificial por meio de refletor odontológico, luvas estéreis descartáveis, instrumental clínico, espátula de madeira e gaze. Todos os achados clínicos foram transcritos para a ficha de registro (Anexo I).

4.5 BIÓPSIA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nos casos em que houve manifestação clínica de lesões em tecido mole compatíveis com neoplasias malignas foram realizadas biópsias incisionais. A análise morfológica das lesões foi confirmada individualmente por três examinadores, utilizando-se um microscópio binocular (Marca Olympus, modelo CX 40).

Os fragmentos do tecido da mucosa bucal foram fixados em solução de formaldeído a 10%, tamponado, por 6 a 12 horas, submetidos a exames macroscópicos, com determinação de características físicas (tamanho, consistência, etc). Após emblocagem em parafina, foram feitas secções com 4µm de espessura e coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). Após montagem

das lâminas, as mesmas foram analisadas quanto às características microscópicas com elaboração do relatório histopatológico definitivo.

O diagnóstico histológico foi confirmado pelos patologistas do setor de anatomia patológica do Hospital Regional da Asa Norte.

As lesões foram classificadas como: Carcinoma de Células Escamosas (CCE Graus I, II e III), Carcinoma Indiferenciado (CA Indiferenciado), Carcinoma In Situ, Hiperplasia e Metaplasia do Epitelial lingual, Hiperplasia Reacional de Tecido Linfóide, Queilíte Actínica e Herpes Simples.

A classificação dos CCEs seguiu os critérios estabelecidos por Barnes *et al.* (79). (tabela abaixo)

Tabela 1 – Critérios da classificação histológica dos carcinomas de células escamosas por Barnes *et al*

Parâmetros morfológicos	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado
Pérolas córneas	numerosas	escassas	ausentes
Queratinização celular /pontes intercelulares	importante	aparente	quase inexistente/ausente
Mitoses por campo histológico	-2	2-4	+4
Mitoses atípicas	raras	algumas	frequentes
Pleomorfismo celular/nuclear	Muito reduzido	moderado	pronunciado

4.6 Cultivo de células

Fragmentos de lesões foram obtidos durante cirurgia para biópsia incisional no Hospital Regional da Asa Norte. Após extração, os fragmentos foram colocados em meio de cultura estéril Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, US), contendo 200U/mL de penicilina G potássica e 200mg/mL de sulfato de estreptomicina (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA).

Amostras de tecido neoplásico foram transferidas para placas de petri estéreis, fragmentadas com bisturi e tesoura. Os fragmentos foram submetidos à digestão enzimática com 0,1% de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ,) pré-aquecida e incubada durante 60 min. a 37°C. Após o período de incubação, o meio DMEM incompleto frio foi adicionado à solução de células digeridas e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sedimento celular foi ressuspensionado em tripsina a 0,25%, 1 mM EDTA (Invitrogen) por 15 minutos a 37 ° C. Meio DMEM frio incompleto foi adicionado ao homogeneizado celular com tripsina e centrifugado como descrito anteriormente. As células sedimentadas foram ressuspensionadas e lavadas 3 X com meio incompleto DMEM e centrifugado. O sedimento celular foi ressuspensionado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma, St. Louis, EUA) e transferidas as células para frasco de cultura de 25 cm³. Os frascos foram incubados em estufa para cultura de células com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37°C. Após o crescimento celular, o meio acidificado foi substituído por meio novo. Ao atingir confluência, as células foram tripsinizadas e transferidas a novo frasco de cultura. Estes passos de tripsinização foram realizados até que as células primárias tornaram-se estabelecidas ou inviáveis para cultivo. A metodologia empregada foi adaptada de Nakatani *et al.* (85).

4.7 Análise Molecular

4.7.1 Amostras clínicas

Para a pesquisa de sequências gênicas de HPV, empregou-se o método da captura híbrida – HC₂ (Qiagen) para os tipos de alto e baixo risco, em 26 amostras obtidas a partir de biópsias incisionais, congeladas inicialmente em nitrogênio líquido. O material clínico coletado foi acondicionado em tubos

coletores de DNA com 1 ml de meio de transporte, previamente identificadas do lote 98052 e data de vencimento 23/09/2013.

4.7.2 Captura híbrida para HPV

Foi utilizado o kit Digene (USA): Hybrid Capture® II HPV Test (Sistema em Microplaca) e a realização do Teste de Captura do Híbrido obedeceu às normas propostas pelo kit. A representação esquemática do teste é mostrada na Figura 4.

PREPARO E DESNATURAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os fragmentos macerados de neoplasma foram transferidos a 200 ul de azida sódica para desnaturação do DNA agitados por 30 segundos (PHOENIX AP 56), seguindo do banho-maria a 65°C por 45 minutos;

HIBRIDAÇÃO

Adiciona-se 25 ul de sonda, RNAHPV, em cada microcavidade e agita-se em um “ROTARY SHAKER” a 1100 rpm por 2 min. Os controles, solução calibradora e espécimes deverão se tornar amarelos. Posteriormente a Microplate & Lid é transferida para a placa de aquecimento a 65° C por 60 min. Sequencialmente os híbridos da reação foram transferidos para a microplaca com partículas de sensibilidade para HPV A e B. A fixação dos híbridos realiza-se com adição de fosfatase alcalina.

LAVAGEM

Em lavador automático de microplacas “AUTOMATED PLATE WASHER”, a placa foi lavada em 6 ciclos.

AMPLIFICAÇÃO DOS SINAIS

Após seca a microplaca adiciona-se 75 ul de substrato (Reagente de Detecção 2) em cada microcavidade de captura. Todas as microcavidades devem se tornar amarelas, com intensidade similar. Após incubação por 20-25°

C por 15-30 minutos, a microplaca é lida em quimioluminômetro DML2000 (Digene) após 15 min de incubação.

O ponto de corte (cutoff), toma em conta os 3 controles negativos, 3 controles positivos, 1 controle de alto risco e outro de baixo risco em cada placa. Os três controles negativos devem estar entre 10 a 250 de RLU (Relative Light Unit). Os 3 controles positivos devem ser relativos aos negativos numa proporção acima de 2 e abaixo de 15 (soma dos 3 controles positivos/soma dos 3 controles negativos). O controle de qualidade baixo deve dar positivo no grupo A e negativo no grupo B. O controle de qualidade alto deve dar positivo no grupo B e negativo no Grupo A.

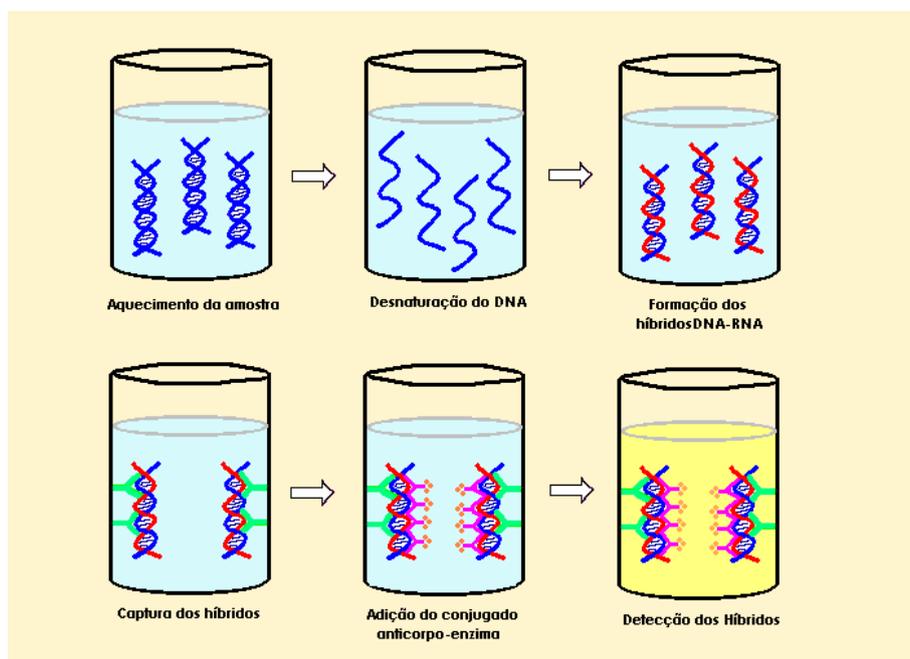


Figura 4 – Esquema da técnica de captura do híbrido (Carestiati, 2004)

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, os dados foram distribuídos conforme a frequência em cada variável. Após esta organização foi executada análise de associação para verificar quais variáveis foram correlacionadas com a presença do estadiamento T0 ou de outro (T1 a T4). O teste escolhido foi o Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando o valor de uma das caselas da tabela 2x2 era

inferior a 5.

O nível de significância adotado foi 5%. O software estatístico adotado foi o SPSS 17.0.

Este trabalho foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa, parecer nº 185/2009 (anexo 2).

Todos os pacientes aceitaram participar da presente pesquisa e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto de pesquisa com o número de 202/09 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FEPESEC (anexo 3).

5 RESULTADO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

No presente estudo foi possível observar a predominância do gênero masculino (n=18, 69,20%) sobre o feminino (n=08, 30,80%). Quanto à origem racial, predominou entre os pacientes do estudo, aqueles de origem caucasiana (n=15, 57,70%). Na faixa etária dos pacientes estudados predominou a faixa de 60 a 69 anos (n=09, 34,60%), seguido das faixas de 40 a 49 anos e de 50 a 59 anos igualmente (n=5, 19, 20 cada). Com relação ao estado civil, houve predominância acentuada em casados (n=15, 57,70%). Dados observados na tabela abaixo.

Tabela 2 – Características sociodemográficas da população do estudo

	Dados	Frequência	%
Gênero	Masculino	18	69,20
	Feminino	8	30,80
	Total	26	100,00
	Dados	Frequência	%
Origem racial/étnica	Caucasiana	15	57,70
	Negra	1	3,80
	Mestiça	10	38,50
	Total	26	100,00
	Dados	Frequência	%
Idade	40 a 49 anos	5	19,20
	50 a 59 anos	5	19,20
	60 a 69 anos	9	34,60
	70 a 79 anos	3	11,50
	80 a 89 anos	4	15,40
	Total	26	100,00

	Dados	Frequência	%
Estado civil	Solteiro	4	15,40
	Casado	15	57,70
	Viúvo	4	15,40
	Separado	3	11,50
	Total	26	100,00

Como fator de risco, encontramos o etilismo, que se apresenta acentuadamente positivo (n=17, 65,40%) (Tabela 02).

Tabela 3 - Quadro demonstrativo do consumo e frequência do etilismo da população em estudo

	Dados	Frequência	%
Etilismo	Sim	17	65,40
	Não	9	34,60
	Total	26	100,00

O intervalo de idade referente ao consumo etílico foi predominante na faixa de 30 a 39 anos (Tabela 03).

Tabela 4 – Intervalo de idade referente ao etilismo

	Dados	Frequência	%
Etilismo/consumo	10 a 19 anos	5	19,20
	20 a 29 anos	2	7,70
	30 a 39 anos	8	30,80
	40 a 49 anos	1	3,80
	50 a 59 anos	4	15,40
	60 a 69 anos	1	3,80
	Sem consumo	5	19,20
	Total	26	100,00

Como fator de risco encontramos também o tabagismo, que se apresenta positivo de forma notadamente elevado (n=21, 80,80%). (Tabela 04).

Tabela 5 – Quadro demonstrativo do consumo e frequência do tabagismo da população em estudo

	Dados	Frequência	%
Tabagismo	Sim	21	80,80
	Não	5	19,20
	Total	26	100,00

O intervalo de idade referente ao consumo de tabaco foi predominante na faixa de 30 a 39 anos (n= 09, 34,60%) (Tabela 05).

Tabela 6 – Intervalo de idade referente ao tabagismo

	Dados	Frequência	%
Tabagismo/Consumo	20 a 29 anos	1	3,80
	30 a 39 anos	9	34,60
	40 a 49 anos	5	19,20
	50 a 59 anos	4	15,40
	60 a 69 anos	2	7,70
	Sem consumo	5	19,20
	Total	26	100,00

Na análise da incidência quanto à localização geográfica das lesões, vê-se que elas foram mais frequentes na orofaringe e língua (Tabela 06).

Tabela 7 – Localização geográfica e frequência das lesões da população em estudo

	Dados	Frequência	%
Local da lesão	Orofaringe	7	26,90
	Língua	7	26,90
	Palato duro	3	11,50
	Assoalho bucal	5	19,20
	Palato mole	1	3,80
	Lábio inferior	3	11,50
	Total	26	100,00

O diagnóstico conclusivo com o laudo histopatológico foi Carcinoma Espino- celular (CEC) com predominância da localização na orofaringe (n=06, 23,10 %), além de outras lesões (Tabela 07).

Tabela 8 – Diagnóstico conclusivo e frequência das amostras da população estudada

	Dados	Frequência	%
Diagnóstico conclusivo	CEC Orofaringe	6	23,10
	CEC Língua	5	19,20
	CEC Palato duro	2	7,70
	CEC Assoalho bucal	5	19,20
	Hiperplasia e metaplasia do epitélio lingual	1	3,80
	Herpes simples	1	3,80
	CEC Palato mole	1	3,80
	Leucoplasia oral	1	3,80
	Hiperplasia reacional de tecido linfático	1	3,80
	CEC Lábio inferior	2	7,70
	Queilite actínica	1	3,80
	Total	26	100,00

Tabela 9 – Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa (p=0,04) com relação ao diagnóstico conclusivo e a variável estadiamento tumoral

		Estadiamento tumoral			p
		T0	outro	Total	
Diagnóstico conclusivo	CEC Orofaringe	N	0	6	6
		% (total)	0,00	23,08	23,08
	CEC Língua	N	0	5	5
		% (total)	0	19	19
	CEC Palato duro	N	0	2	2
		% (total)	0,00	7,69	7,69
	CEC Assoalho bucal	N	0	5	5
		% (total)	0,00	19,23	19,23
	Hiperplasia e metaplasia do epitélio lingual	N	1	0	1
		% (total)	3,85	0,00	3,85
	Herpes simples	N	1	0	1
		% (total)	3,85	0,00	3,85
	CEC Palato mole	N	0	1	1
		% (total)	0	3,85	3,85

	% (total)	0,00	3,85	3,85
Leucoplásia oral	N	1	0	1
	% (total)	3,85	0,00	3,85
Hiperplasia reacional de tecido linfático	N	1	0	1
	% (total)	3,85	0,00	3,85
CEC Lábio inferior	N	0	2	2
	% (total)	0,00	7,69	7,69
Queilite actínica	N	1	0	1
	% (total)	3,85	0,00	3,85
Total	N	5	21	26

Tabela 10 – Teste exato de Fisher. Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,01$) com relação à cor da lesão e à variável estadiamento tumor

Cor lesão	Avermelhada	N	2	20	22	0,01
		% (total)	7,69	76,92	84,62	
	Normal	N	1	0	1	
		% (total)	3,85	0,00	3,85	
	Vermelha e branca	N	1	1	2	
		% (total)	3,85	3,85	7,69	
	Branca	N	1	0	1	
		% (total)	3,85	0,00	3,85	
	Total	N	5	21	26	
		% (total)	19,23	80,77	100,00	

Tabela 11 – Teste Exato de Fisher. Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) com relação ao etilismo e à variável estadiamento tumoral

Etilismo	Sim	N	1	16	17	0,03
		% (total)	3,85	61,54	65,38	
	Não	N	4	5	9	
		% (total)	15,38	19,23	34,62	
Total	N	5	21	26		
	% (total)	19,23	80,77	100,00		

Tabela 12 – Evidenciação que houve associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) com relação ao tabagismo e à variável estadiamento tumor

	Sim	N	2	19	21	
Tabagismo		% (total)	7,69	73,08	80,77	0,03
	Não	N	3	2	5	
Total		% (total)	11,54	7,69	19,23	
		N	5	21	26	
		% (total)	19,23	80,77	100,00	

5.2 ANÁLISES DE RESULTADOS

5.2.1 Resultados dos exames clínicos

Foram analisadas clinicamente 26 lesões, assim distribuídas:

Tabela 13 – Tabela relacionada aos exames clínicos da população da amostra estudada

	Orofaringe	Assoalho Bucal	Língua	Lábio inferior	Palato duro
Úlcero-infiltrante – 22					
Fundo necrótico-19 normal- 03					
Consistências: normal-02 endurecida-14	8	5 (figura 7)	4 (figura 5)	2	2
Tamanhos: 1 a 4 cm					
Formas: irregular- 18 regular- 03					
Limites: nítidos- 05 não nítidos- 16					
Úlcero-vegetante – 1					
Fundo necrótico					
Consistência: endurecida		1 (figura 6)	1 (figura 8)		
Tamanho: 3,5 cm					
Forma: irregular					
Limite: não nítido					

	Orofaringe	Assoalho Bucal	Língua	Lábio inferior	Palato duro
Leucoplásica- 2					
Consistência: normal					
Tamanhos: 2,5 e 3 cm					
Forma: irregular- 01				1	1
regular- 01					
Limites: nítidos- 02					
Nodular – 1					
Consistência: normal					
Tamanho: 3,5 cm		1			
Forma: regular					
Limite: nítido					



Figura 5 – Carcinoma epidermóide de língua úlcero-infiltrativa



Figura 6 – Carcinoma epidermóide de assoalho bucal úlcero-vegetante



Figura 7 – Carcinoma epidermóide de assoalho bucal úlcero-infiltrativo



Figura 8 – Carcinoma epidermóide de língua úlcero-vegetante

5.2.2 Resultados exames histopatológicos

Diagnóstico/biópsia

Tabela 14 – Quadro demonstrativo da idade e diagnóstico conclusivo

	Orofaringe	Assoalho bucal	Língua	Lábio inferior	Palato Duro	Palato Mole
Bem diferenciado	02	03	01	01	01	00
Moderadamente diferenciado	04	04	03	01	00	01
Indiferenciado	06	07	04	02	01	00
Hiperplasia/ metaplasia epitélio lingual			01			
Sugestivo Herpes simples			01			
Leucoplasia oral					01	
Hiperplasia Reacional Tecido Linfóide	01					
Queilite actínica				01		

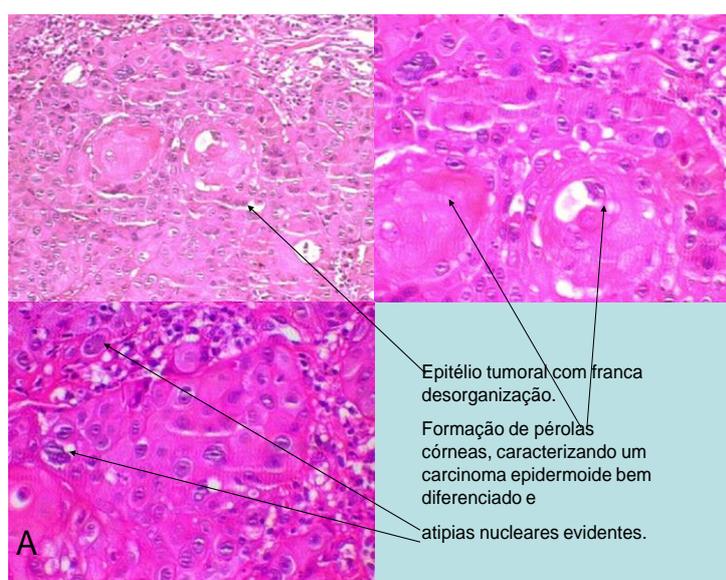


Figura 9 – Carcinoma epidermoide bem diferenciado

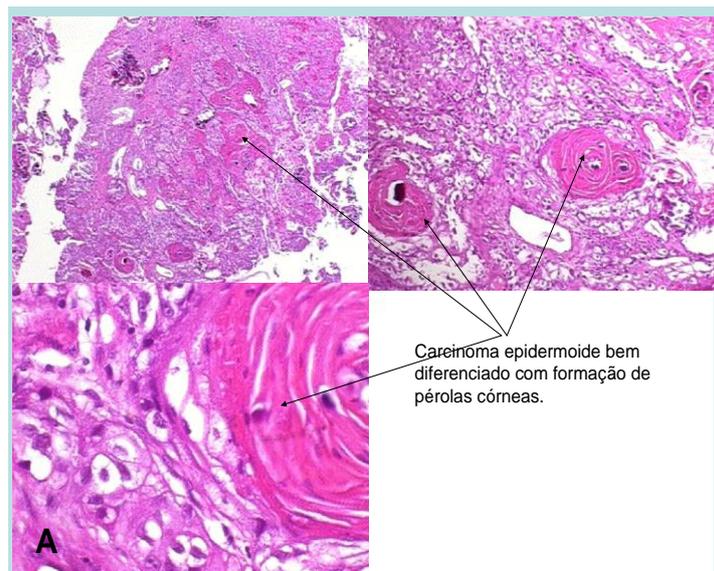


Figura 10 – Carcinoma epidermóide bem diferenciado

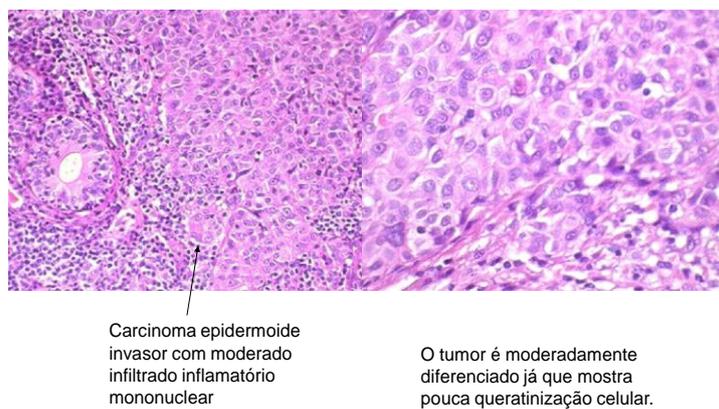


Figura 11 – Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado

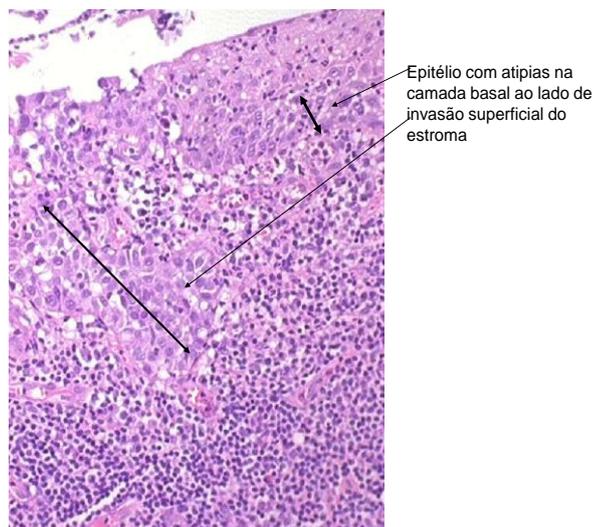


Figura 12 – Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado

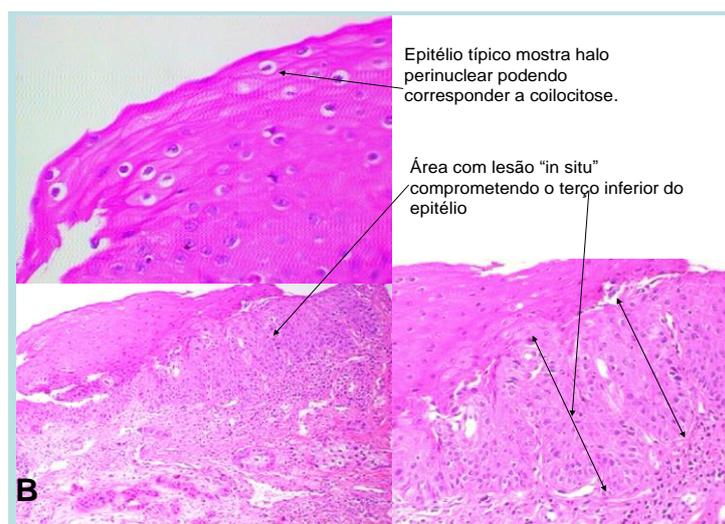


Figura 13 – Imagem tumoral indicativo da presença de coilocito



Figura 14 – Imagem tumoral não conclusivo para coilócito

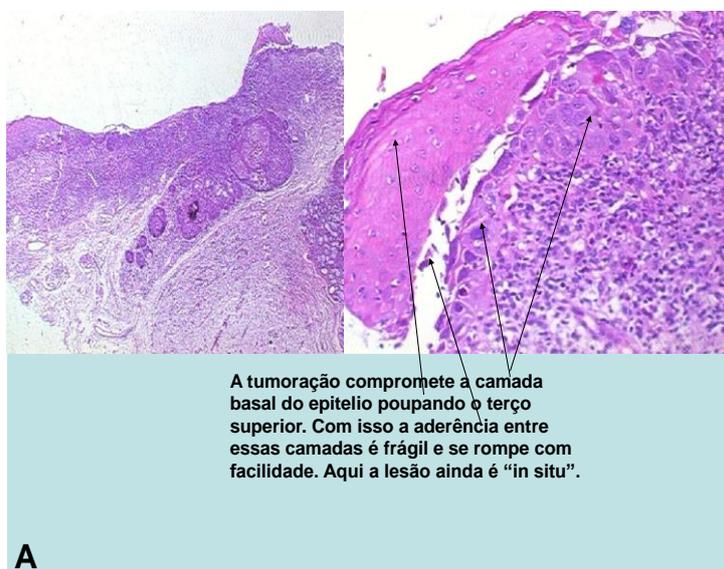


Figura 15 – Imagens Carcinoma epidermóide *in situ*

5.2.3 Resultados do cultivo de células

Após 11 a 12 meses de cultivo, entre 8 a 12 passagens ou tripsinizações, as células primárias tornaram-se estabelecidas. Entre 10 amostras de fragmentos de neoplasma processados para cultivo, apenas 03 atingiram cultivos permanentes. Alguns cultivos apresentaram morfologia típica de células epiteliais e outros de células fibroblásticas (Figuras 16, 17, 20, 21).

Análises citológicas de lâminas preparadas com estes cultivos apresentaram células escamosas de tamanho e forma irregulares exibindo núcleos hipercromáticos, aumentados de volume com membranas nucleares espessadas e cromatina grosseiramente granulosa (Figuras 18, 19).

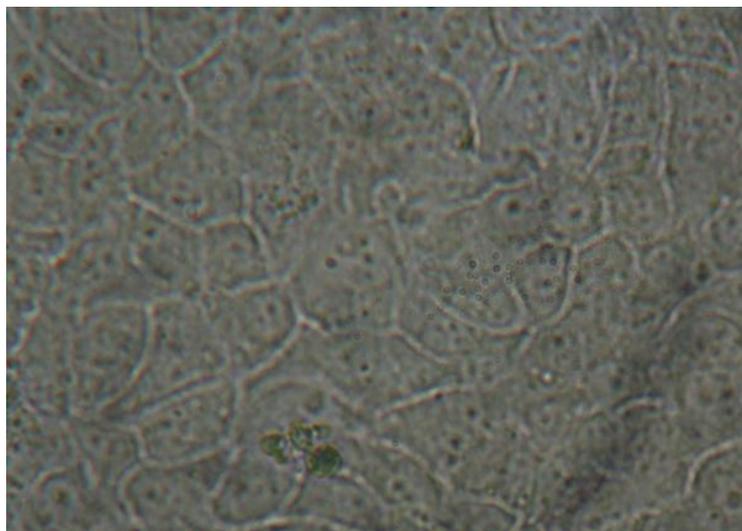


Figura 16 – Paciente 01, passagem 11, 31/05/11 (100x)

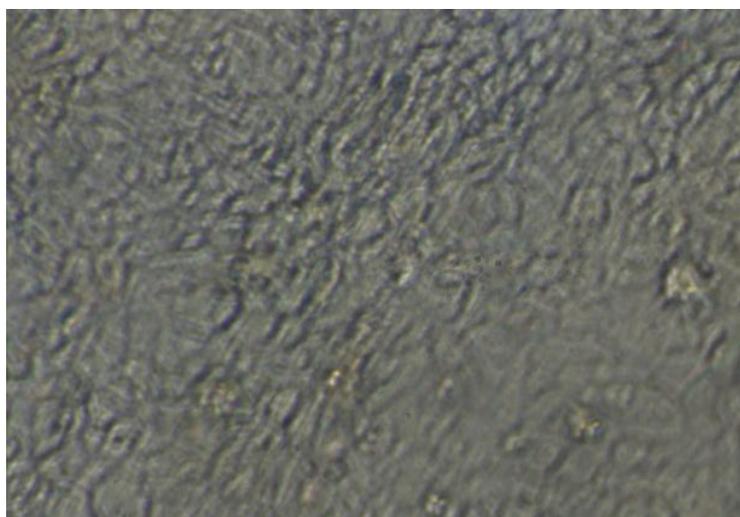


Figura 17 – Paciente 01, passagem 10, 04/05/11 (100x)



Figura 18 – Paciente 01, passagem 12, 05/07/11 (400x)



Figura 19 – Paciente 01, passagem 12, 05/07/2011(400x)

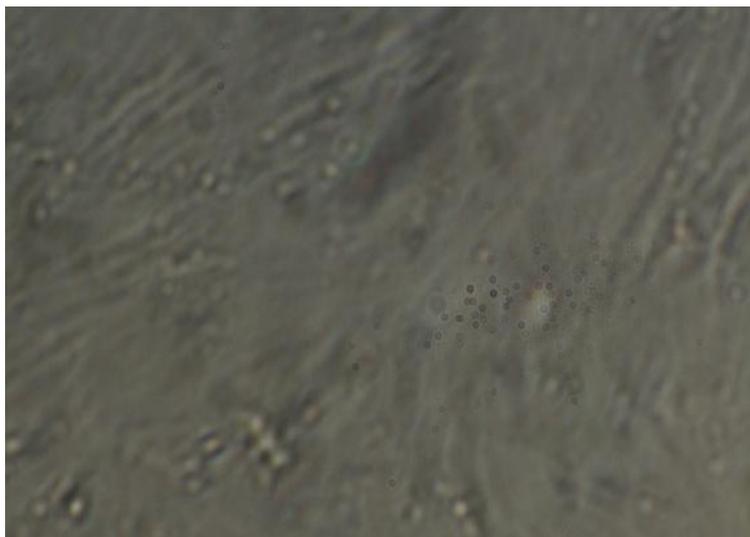


Figura 20 – Paciente 02, passagem 08, 16/06/2011



Figura 21 – Paciente 03, passagem 08, 04/05/2011

5.2.4 Resultados dos exames moleculares

TIPO A

O Cutoff (ponto de corte) para os resultados da captura híbrida do Grupo A foi de 300 RLUs, ou seja, para positivar o resultado do exame da detecção da sequência gênica de HPV-A, deveria ser acima de 300 RLUs, entretanto,

como se observa no gráfico abaixo, o valor mínimo foi de 65 RLU dos pacientes 04 e 24, e o valor máximo foi de 115 RLU dos pacientes 10 e 15, abaixo do 300 RLU do Cutoff (gráfico 01).

Os cálculos de validação da Hybrid Capture® II HPV Test (Sistema em Microplaca) QIAGEN para o grupo A validaram o teste.

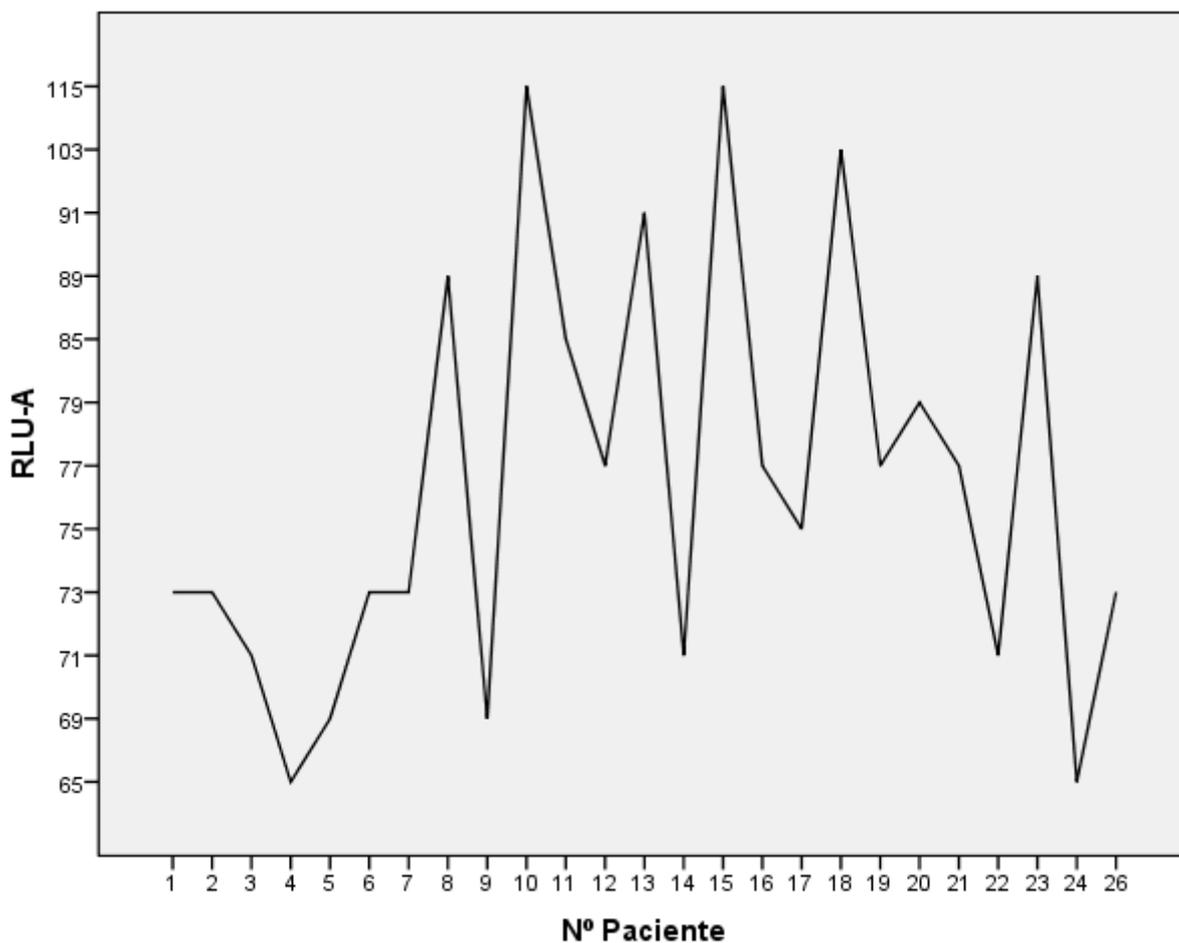


Figura 22 – Resultados da captura híbrida da população do estudo - Tipo A

TIPO B

O Cutoff (ponto de corte) para os resultados da captura híbrida do Grupo B foi de 474 RLU, ou seja, para positivar o resultado do exame da detecção da sequência gênica de HPV-B, deveria ser acima de 474 RLU, entretanto, como observado no gráfico abaixo, o valor mínimo foi de 63 RLU do

pacientes 14, e o valor máximo foi de 115 RLUs do pacientes 10, abaixo do 474 RLUs do Cutoff (gráfico 2).

Os cálculos de validação da Hybrid Capture® II HPV Test (Sistema em Microplaca) QIAGEN para o grupo B validaram o teste.

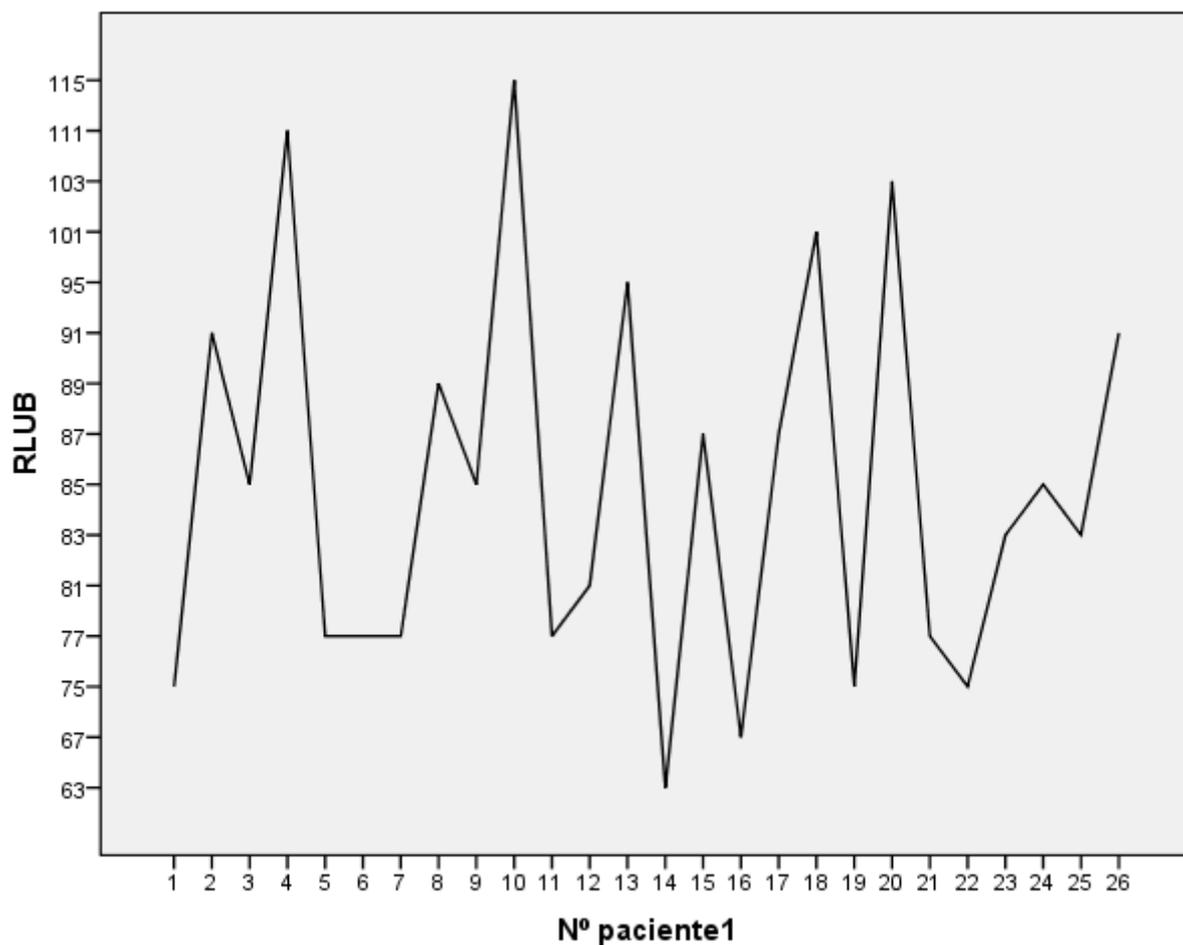


Figura 23 – Resultados da captura híbrida da população em estudo - Tipo B

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer é um grave problema de saúde pública e acredita-se que sua taxa de mortalidade aumentará em 50% nos próximos 20 anos, com sua incidência variando entre 1 a 10 casos a cada 100.000 habitantes pelo mundo (86).

O grupo de Syrjänen, em 1983, sugeriu pela primeira vez a possibilidade do envolvimento do HPV com neoplasmas bucais. Estabelecer a associação do vírus com o Carcinoma Espinocelular Bucal (CECB) tem sido difícil, provavelmente devido à sua heterogeneidade e ao fato de que apenas uma parcela destas malignidades possa estar infectada pelo vírus. O estabelecimento nas pesquisas da localização da massa neoplásica no que diz respeito a ter sua origem na cavidade bucal ou na orofaringe é importante (12).

Assim, desde os trabalhos iniciais em 1983, inúmeras pesquisas na área da Odontologia têm buscado esclarecer o papel do HPV na carcinogênese das neoplasias de cabeça e pescoço. A variabilidade dos achados é bastante ampla e significativa, e estudos mostram associação de 0% até 100% do vírus com estes neoplasmas, principalmente com o CECB (52,87). (tabela 15)

Tabela 15 – Variabilidade dos achados do HPV na carcinogênese das neoplasias de cabeça e pescoço

Ano	Estudo	Nº casos	Amostra	Pais	Métodos	HPV
2004	Vidal <i>et al</i>	40	Esfoliação	Brasil	HC	11
2005	Koppikar <i>et al</i>	102/83*	Biópsia	India	PCR	18*
2007	Furniss <i>et al</i> .	314*	Parafina	EUA	PCR	74
2008	Liang <i>et al</i>	51*	Biópsia	EUA	PCR	01

Ano	Estudo	Nº casos	Amostra	Pais	Métodos	HPV
2008	Scapoli <i>et al</i>	208	Biópsia	Italia	HC	05
2008	Gillisson <i>et al</i>	240	Biópsia	EUA	ISH	92

A discussão presente na literatura tem procurado responder à razão desta variabilidade e muitas são as hipóteses sugeridas. Fatores relacionados com a sensibilidade e especificidade dos testes moleculares utilizados para detecção do DNA viral, o tipo de amostra utilizada para extração do DNA, o tipo de neoplasia e sua localização, o tamanho da amostra nos estudos realizados, a abordagem epidemiológica empregada, as variabilidades sócio-demográficas, socioculturais e regionais das populações em estudo são citados na literatura (52, 88-90).

6.2 HPV E CÂNCER BUCAL E DE OROFARINGE

Jarboe *et al* (91) compararam o kit da Qiagen HR-HPV Captura Híbrida 2 com o HR-HPV em teste de hibridação *in situ* e concluiu que o kit QIAGEN é método confiável e eficaz para detectar HPV em carcinomas epidermóides de orofaringe (92). Atualmente Qiagen / Digene Captura Híbrida 2 HR-HPV é o teste de HPV aprovado pelo FDA (Administração de Drogas e Alimentos) nos Estados Unidos (93). Apesar de vários estudos comparativos mostrando a especificidade e sensibilidade, sendo o método mais utilizado para detectar o HPV, Poljak *et al* (94) afirmam que a Abbott RealTime Alto Risco teste HPV mostrou especificidade analítica excelente e nenhuma reatividade cruzada com os genótipos de HPV de baixo risco testado positivamente com a Captura Híbrida Qiagen / 2 Teste Digene.

Devido à forte associação entre HPV de alto risco ou oncogênico e lesões intra-epiteliais escamosas, o teste molecular de CH tem sido investigado

em numerosos estudos, com objetivo de garantir sua utilização como coadjuvante na interpretação do diagnóstico citológico (95, 96).

Considerando-se os métodos diagnósticos para HPV, a utilização do consensus primer na técnica de PCR torna o método mais eficiente e com menor possibilidade de erro (97), mas, sem dúvida, a captura híbrida representa um teste seguro e fiel, necessitando apenas que haja redução de custo para viabilizar sua realização em larga escala sob forma de screening, haja vista a excelente contribuição ao diagnóstico precoce do câncer de colo uterino (77), e sua aplicabilidade na cavidade bucal.

Sugiyama *et al.*(98) consideram o material biopsiado uma amostra mais representativa da mucosa bucal quando comparada à citologia esfoliativa, pois a primeira inclui também células da camada basal onde o vírus pode estar em sua forma latente ou produtiva. As amostras deste estudo foram provenientes de biópsia incisional (apenas um parte do neoplasma) da lesão propriamente dita.

O presente estudo avalia uma série de casos de neoplasia suspeitos de malignidade de boca e orofaringe e buscou superar algumas das diferenças dos achados da literatura por meio de construção metodológica que levou em consideração limitações existentes e citadas nos estudos revisados, principalmente no que concerne ao método de diagnóstico molecular utilizado. Assim, foram tomadas as seguintes precauções: i) as amostras de tecidos suspeitos de malignidade eram de tecido biopsiado fresco e congelado, para evitar maiores danos ao DNA; ii) as amostras eram livres de tecido normal, para garantir que o DNA do HPV estivesse comprometido com o neoplasma. Não se tem conhecimento desse exame com a captura híbrida de fragmentos de biópsia no Distrito Federal.

Neste estudo não ficou demonstrada a infecção pelo HPV e câncer de cavidade oral e orofaringe, de acordo com os resultados moleculares e histopatológicos. Em nenhuma das 26 amostras analisadas detectou-se sequências gênicas dos tipos de HPV mais freqüentes, baixo risco (6, 11, 42-44) e alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), talvez pelo tamanho da amostra, localização da neoplasia, técnica utilizada, embora, a variabilidade dos achados seja bastante ampla e significativa, e estudos mostram uma associação de 0% até 100% do vírus com estes tumores,

principalmente com o CECB (35,86). Zeuss, Miller e White (99) relatam que a identificação do HPV não ocorre em todas as lesões malignas bucais.

Análise mais aprofundada das amostras de DNA extraídas de tecidos de pacientes será realizada a fim de confirmar os resultados negativos obtidos utilizando o Qiagen / Digene Captura Híbrida 2 Teste.

6.3 INTERPRETAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA

Na cavidade oral, o carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais prevalente, representando de 90% a 95% das lesões malignas nessa localização (5, 7, 10, 16). Resultados semelhantes foram observados nos pacientes incluídos neste estudo, pois 21 dos 26 pacientes da amostra apresentavam CEO que dá um percentual de 84,01%.

A definição do perfil epidemiológico do câncer bucal passa pela determinação dos fatores de risco. Assim, há unanimidade quanto ao predomínio do gênero masculino (9, 17, 20), sobretudo pela utilização do tabaco, hábito maior entre os homens. A relação masculino: feminino encontrada nesse estudo foi de 5,25:1. Entretanto, Neville & Day (80) encontraram uma relação de 2,26:1, Amorim-Filho *et al.* (100) encontraram uma relação de 8:1. Outros autores já verificaram uma relação de 3,35:1. Essa maior proporção de casos de câncer no gênero masculino tem se tornado menos pronunciada nas últimas décadas. De acordo com Neville & Day (80), atualmente as mulheres têm sido mais frequentemente expostas aos principais agentes carcinógenos, tais como tabaco e álcool. Entretanto, Tarvainen *et al.* (101) referem que a incidência do câncer de boca tem aumentado em ambos os gêneros, possivelmente em decorrência do aumento do consumo de álcool.

No que concerne à exposição ao tabaco e ao consumo de álcool, estes dois fatores ainda são os mais relacionados com o CECB. Todavia, a literatura tem apresentado estudos que mostram a presença de neoplasia na ausência de ambos os fatores de risco mais amplamente estudados, e a infecção por HPV tem sido sugerida como fator etiológico associado (25,102,103).

Em relação à origem étnica/racial, a maioria foi composta por indivíduos de ancestralidade caucasiana. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (7, 8). Apenas Brener *et al.* (104) relataram maior prevalência em indivíduos mestiços, achado provavelmente resultante da metodologia aplicada ou região estudada.

Neville & Day (80) também afirmaram que o carcinoma espinocelular de boca ocorre mais comumente em indivíduos de meia idade e idosos, embora nos últimos anos, inúmeros casos tenham sido documentados em pacientes adultos jovens. Dos 102 casos incluídos no estudo de Sawair *et al.* (105), a média de idade dos pacientes foi de 64 anos. No que diz respeito à faixa etária dos pacientes avaliados, a mais acometida foi a 6ª década, seguida pelas 5ª, 7ª e 8ª décadas de vida, não ocorrendo nenhum registro abaixo da 3ª década, semelhantes aos da literatura (2, 22). O resultado desse estudo confirma tal dado com uma média de 62 anos de idade e faixa etária de 60 a 69 anos. Um caso atípico foi de uma jovem de 25 anos com câncer de língua no estado de São Paulo relatado por Hirota *et al.* (106).

Os resultados deste estudo demonstraram que os locais anatômicos mais acometidos pelo câncer bucal foram assoalho bucal, orofaringe e língua. Analisando os estudos relatados por outros autores, constatou-se que a maior prevalência é realmente em borda lateral de língua seguida pelo assoalho bucal (6, 7, 9, 16, 18, 19). Apenas Abdo *et al.* (107) encontraram maior prevalência em assoalho bucal, seguido por língua e região retromolar.

Quanto às características clínicas, o tipo de lesão predominante nas amostras foi a úlcero-infiltrativa, seguido pela úlcero-vegetante. Outros autores também relatam maior incidência de lesões úlcero-infiltrativas (108-109, 99).

O sistema de graduação histopatológica proposto por Barnes *et al.* (79) para os tumores de boca recomenda três categorias: Grau I (bem diferenciado), Grau II (moderadamente diferenciado) e Grau III (pouco diferenciado). Um mesmo tumor pode apresentar diferentes graduações e, nesses casos, o grau mais elevado determina a categorização final. Convém ressaltar que esse sistema de classificação apresenta como limitações sua natureza subjetiva, o fato de que pequenos fragmentos biopsiados podem revelar heterogeneidade histológica e falta de representatividade (108). Vidal *et al.* (110) em quarenta casos de carcinoma de espinocelular encontrou em sua totalidade tipo I e II.

Neste estudo houve ligeira predominância do tipo II com 11 casos, seguido pelo tipo I com 10 casos (Figuras 8, 9, 10, 11, 12).

A determinação do tamanho da lesão primária, o número de linfonodos regionais comprometidos e a presença de metástases distantes são parâmetros amplamente utilizados para se determinar o prognóstico do CCE. (104).

Bryne *et al.* (111) desenvolveram um sistema de gradação histopatológica de malignidade que avalia cinco aspectos microscópicos. São eles: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses atípicas, padrão de invasão e resposta do hospedeiro.

No presente estudo, verificaram-se, pelo menos, em duas amostras imagens sugestivas de coilocitose. Para alguns autores, é sinal patognomônico da infecção pelo HPV (Figura 13 e 14). Entretanto, os ensaios moleculares não confirmaram a detecção do DNA viral.

6.4 INTERPRETAÇÃO DO CULTIVO DE CÉLULAS

A utilização da cultura de células tumorais crescidas em ambiente já era feita desde os trabalhos iniciais desenvolvidos por Moscona em 1957 (113), que analisou a interação de células de melanoma em agregados celulares que ele denominou de quimeras. Esses agregados apresentavam uma morfologia semelhante aos tumores que os originaram, mantendo até as propriedades invasivas quando estas eram crescidas em associação com células normais.

Já Halpern e seus colaboradores em 1966 (114) mostraram que o arranjo destes agregados bem como a sua tumorigenicidade eram diferentes quando se utilizava células normais do que quando se utilizava células neoplásicas .

Assim também ocorreu com o presente estudo. A análise citológica das lâminas preparadas com este cultivo, apresentaram uma morfologia similar às células neoplásicas com tamanho e forma irregulares, exibindo núcleos hiper cromáticos, aumentados de volume com membranas nucleares espessadas e cromatina grosseiramente granulosa, similares às células que as

deram origem, sem presença de células normais, já que as amostras foram do meio da massa neoplásica.

Apesar de iminente, a sistematização e padronização de um modelo que mimetizasse o ambiente e metabolismo de um tumor ainda não foram concretizadas. Isso mudou após os trabalhos desenvolvidos por Sutherland e seus colaboradores em 1971 (115).

7 CONCLUSÃO

1. Não houve detecção dos tipos mais comuns do vírus do papiloma humano (HPV) nas amostras estudadas;
2. Não se estabeleceu correlação entre presença do DNA viral e laudos histopatológicos das amostras de lesões de cavidade oral e orofaringe;
3. Definiu-se um perfil epidemiológico e clínico dos pacientes com neoplasias de cavidade oral e orofaringe dos casos estudados;
4. Obtiveram-se nas amostras linhas celulares primárias de neoplasias de cavidade oral e orofaringe para confirmação das análises histopatológicas e moleculares através do cultivo celular;
5. Evidenciou-se também a premente necessidade de maiores estudos do HPV na cavidade oral, devido ao tropismo do HPV com a mucosa bucal, em especial os tipos 16, 18, 31, 33 e 35, considerados oncogênicos pela literatura;
6. Também merece ressalva o papel da captura híbrida como exame molecular para amostras de cavidade oral, ainda desconhecidos por muitos, já que se emprega de forma rotineira o uso da escova do kit para tal exame e este estudo mostra a viabilidade desta modalidade, com a capacidade do kit de ensaiar 40 amostras de um só vez e podendo investigar mais de 17 tipos de HPV, impraticável nos ensaios atuais de amplificação gênica /PCR;
7. Foram cultivadas células das amostras estudadas sob as condições adequadas, em 3 pacientes. Estabeleceram-se linhagens, possibilitando análises cromossômicas, detecção molecular de oncogenes, de proteínas envolvidas na oncogênese e, em caso de células infectadas com HPV, a utilização das mesmas para produção de antígenos virais para desenvolvimento de kits de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

01. Brasil. Instituto Nacional do Câncer (Homepage). Rio de Janeiro, RJ: Dados sobre Câncer Bucal; 2010 [acesso em 2010 Jan 10]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/boca>.
02. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil-2010. Rio de Janeiro: INCA, 2007
03. World Health Organization. The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all. Geneva: WHO; 1998. p. 61-111.
04. National Cancer Institute [homepage na internet]. What is cancer? [acesso em 2010 Out 23]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>
05. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004a Feb; 108(5): 766-72.
06. Gillison AL; Shah KV. Role of mucosal human papillomaviruses in nongenital cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, Oxford, 2003; 31: 57-65 .
07. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editores. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Scientific Publications, 2002.
08. Ries LAG. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute.(acesso em 2009 Jan 24). Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/
09. Sundfeld M. Análise de sobrevivência de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de boca, em Araçatuba, de 1980 a 1995 [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1999.142 p.
10. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*. 2008 Jan; 30(1):75-84.
11. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: review. *J Clin Virol*. 2005 Mar; 32(1): 59-66.
12. Herrero R. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive Tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 7(31): 47-51.
13. Cox MF, Scully C, Maitland N. Viruses in the aetiology of oral carcinoma?

Examination of the evidence. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1991 Dec; 29(6): 381

14. Lai C, Shields PG. The Role of Interindividual Variation in Human Carcinogenesis. *J Nutr* 1999; 129:552-5.

15. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). O problema do câncer no Brasil. 4a ed. Rio de Janeiro: INCA; 1997.

16. Iamaroon A. *et al.* Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(1): 30-36.

17. Gervasio, O.L. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J.* 2001; 12(1): 57-61.

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

19. Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen 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.

20. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Jul; 43(6): 523-34. Epub 2007 Jan26.

21. Hindle I; Dower MC; Speight PM. The epidemiology of oral cancer *British. J of Oral and Maxillofacial Surg.* 1996 oct ; 34 (5): 471-76 .

22. Regezi JA, Sciubba JJ. Condições ulcerativas. In: *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 2, p. 27-75.

23. Neville BW *et al.* *Patologia Oral e Maxilofacial.* 2 ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 705 p.

24. Brooks PL. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21 (6): 1073-82.

25. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol.* 2002; 38(6): 610-17.

26. Castro TPPG, Filho IB. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol .* 2006 mar-apr; 72(2): 272-82.

27. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
28. Perussi MR *et al* . Carcinoma Epidermóide de Boca em Idosos. Rev Assoc Med Bras. 2002; 48(4): 341-344.
29. World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. Revista Panamericana de Salud Publica. 2002; 12(5): 366-7.
30. Instituto Nacional de Câncer. Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. Rev Bras Cancerol. 2002; 48(3) : 317-32.
31. Garófolo A, Avesani CM, Camargo KG, Barros ME, Silva SRJ, Taddei JAAC, et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. Rev Nutr. 2004; 17 (4): 491-504.
32. Franco EL, Kowalski, LP, Oliveira BV. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. Int J Cancer. 1989 ; 43: 992- 1000.
33. Molina, PE *et al*. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. Alcohol Clin Exp Res. 2002; 21(6): 120-128.
34. Zur Hausen H. Papillomaviruses and câncer: from basics studies to clinical application . Natural reviews , câncer . 2002 may; 2:342-350.
35. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 Jul; 82(1): 57-68. Comment in: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997 Feb; 83(2): 187-8.
36. Terai M, et al. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity adults. Orl Microbiol Immunol, Denmark. 1999; 14(4): 201-05.
37. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: review. J Clin Virol. 2005 Mar; 32: 59-66.
38. Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e patogênese do papilomavírus humano (HPV). I Congresso Brasileiro de HPV, nº 1, São Paulo: BG Editora; 2000; 1: 01-06.
39. Tenti P, et al. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. Obstet Gynecol.1999 apr.; 93(4): 475-479.

40. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Nov; 90(21):1626-36. Comment in: *J Natl Cancer Inst.* 1998 Nov; 90(21): 1585-6.
41. Rosenblatt C, et al. HPV na prática clínica. 1ª ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. 285p.
42. Jacyntho C, Almeida GF, Maldonado P. HPV, infecção genital feminina e masculina. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.127p.
43. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med.* 1991 Aug; 20(7): 305-17.
44. Perrone M, Premoli-de-Percoco G. Papilomavirus humanos: asociación con ciertas lesiones de la cavidad bucal. *Acta Odontol.* 1992; 30(1-2): 59-62.
45. Arrand JR, Harper DR. Viruses and human cancer. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998.p.79-80.
46. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck.* 1998 May; 20(3): 250-65.
47. Phillips AC, Vousden KH. Human papillomaviruses and cancer. In: Arrand JR, Harper DR. Viruses and human cancer. Washington: Bios Scientific Publishers, 1998. p. 39-64.
48. Queiroz LB. Avaliação da expressão das proteínas p53 e pRb em carcinoma escamocelular e papilomas orais pelo método imuno-histoquímico [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2006.
49. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer.* 2003 Apr; 104(3): 336-44.
50. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004 Nov; 78(21): 11451-11461.
51. Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May ; 92(9): 690-8

52. Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral Oncol.* 2004 May; 40(5): 520-4.
53. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jul ; 15(4): 188-96.
54. Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 2004 May; 33(5): 260-3. Comment in: *J Oral Pathol Med.* 2005 Jan; 34(1): 62-3; author reply 63-4.
55. Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990 Jan; 99(1): 55-61.
56. Palefsky JM, Silverman S Jr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med.* 1995 May; 24(5): 193-7.
57. Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg MA, Pyrhönen S. Human Papillomavirus (HPV) Involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc.* 1983a; 79(1): 1-8.
58. Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg.* 1983b Jun; 21(2): 147-53.
59. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983c Dec; 12(6): 418-24.
60. Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Happonen RP, Lamberg MA. In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosa lesions. *Arch Dermatol Res.* 1987; 279(8): 543-9.
61. Meanwell CA, Cox MF, Blackledge G, Maitland NJ. HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implications for behaviour of cervical neoplasia. *Lancet.* 1987 Mar ; 1(8535): 703-7.
62. Gassenmaier A, Hornstein OP. Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas.

Dermatologica. 1988; 176(5): 224-33.

63. Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Dermatopathol*. 1991 Aug; 13(4): 386-95

64. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*. 1992 Mar; 79(3): 328-37.

65. Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infec Dis*. 2002 Mar15; 185(6): 833-6.

66. Vidal AKL, Caldas Jr AF, Brandão VRA, Rocha GI, Taromaru E, Lima DLT et al. Detecção do papilomavírus humano (HPV) pela captura híbrida® (tecnologia digene) em lesões malignas da cavidade bucal. *Odontologia Clin Cientif*. 2001 Jul-Dez; 4(2): 129-36.

67. Vidal AKL, Caldas Jr AF, Mello RJV, Brandão VR, Rocha GI, Taromaru E. HPV detection in oral carcinomas. *J Bras Patol Med Lab*. 2004 Jan-Fev; 40(1): 21-26.

68. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otorinol*. 2006 Aug; 31(4): 259-66.

69. Wallin KL, van Doornum GJ, Andersson-Ellström A, Kallings I, Wiklund F, Hallmans G et al. Seroepidemiology of human papillomavirus type 73: a sexually transmitted low-risk virus. *Int J Cancer*. 2000 Feb; 85(3): 353-7.

70. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15; 121(8): 1813-20.

71. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998; (10): 287-296 .

72. Fornatora M; Jones AC, Kerpel S, et al. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (Koilocytic Dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 1996 Jul ; 82(1) : 47-56.

73. Do Carmo EFS, Fiorini A . *Saúde e Biol. SaBios-Rev*. 2007 jan/ jun ; 2(1): 29-31.

74. Dehn D, Torkko KC ,Shroyer KR. Human papillomavirus testing and

molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*. 2007 Feb; 111(1): 74-78 .

75. Fairthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human Papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *Clin. Pathol.*1994; 47:649-52.

76. Borges SCV, Melo, VH, Mortoza GJ, et al. Taxa de detecção do papilomavírus humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev. Bras. Ginecol Obstet.* 2004; 26(2): 105-10.

77. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. *Path.* 2000; 20:1-29.

78. Bsoul SA, Huber AM, Terezhaimy GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: A comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract.* 2005; 6:1-18.

79. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon (França): IARC Press; 2005.

80. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA J Clin.* 2002; 52(4):195-215

81. Birman EG, Sugaya NN. Citologia no diagnóstico do cancer bucal. In: Kowalski, LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. *Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal: Hospital do Câncer e Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas*. 1ed. São Paulo: Frôntis Editorial; 1999. p. 107-11.

82. Silverman S, Becks H, Farber SM. The diagnostic value od intraoral cytology. *J. Dent Res.* 1958; 37(2): 195-205.

83. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Austr Dent J.* 1996; 41(2): 71-4.

84. Remmerbach TW, Weidenback H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol.* 2001; 22(4): 211-21.

85. Nakatani H, Akimori T, Takezaki Y, Hanazaki K. Vascular endothelial growth factors and their receptors in the novel human cell line, HN-Eso-1, established from esophageal spindle cell carcinoma. *J Med Invest.* 2010 Aug; 57(3-4):232-6.

86. WHO. *Epidemiology*. CDOE05_vol33_397_9/en/ [acesso em 2010 Jan].

Disponível em: http://www.who.int/oral_health/publications

87. 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. Comment in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb; 93(2): 125-6.
88. Puranen M et al. Vertical transmission of human papillomavirus from infected mothers to their newborn babies and persistence of virus in childhood. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Feb; 174: 694-699.
89. Psyrris A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008 Jan; 5(1): 24-31.
90. Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Mar; 99(3): 311-5.
91. Jarboe EA, Willis M, Bentz B, Buchmann L, Hunt J, Ellis G, Layfield L. Detection of human papillomavirus using hybrid capture 2 in oral brushings from patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135(5): 766-9.
92. Tezal M, Sullivan NM, Stoler DL, Melendy T, Hyland A, Smaldino PJ, Rigual NR, Loree TR. Chronic periodontitis-human papillomavirus synergy in base of tongue cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 135(4):391-6.
93. Um TH, Lee EH, Chi HS, Kim JW, Hong YJ, Cha YJ. Comparison of HPV genotyping assays and Hybrid Capture 2 for detection of high-risk HPV in cervical specimens. *Ann Clin Lab Sci.* 2011; 41(1): 48-55.
94. Poljak M, Kovanda A, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E. The Abbott RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2009 ; 18(3): 94-103
95. Carvalho M, et al. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7:1-8.
96. Castle PE, et al. Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin. Microbiol.* 2002; 40(10): 88-90.
97. Gillison ML, Shah KV. Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 57-65.

98. Sugiyama, M, et al. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(5): 594-600.
99. Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71(6): 714-20
100. Amorim-Filho FS, Andrade-Sobrinho J, Rapoport A, Novo NF, Juliano Y. Estudo clínico-epidemiológico do carcinoma epidermóide da base da língua. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003; 69(2): 175-9.
101. Tarvainen L, Suuronen R, Lindqvist C, Malila N. Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17,383 cases in 1953-1999. *Oral Dis.* 2004; 10(3): 167-72.
102. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3; 92(9): 709-20.
103. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV 16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(23): 1801-10.
104. Brener S, et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras de Cancerol.* 2007; 53:63-69.
105. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(1): 1-9.
106. Hirota SK, et al. Carcinoma epidermóide oral em paciente jovem – Relato de caso e revisão da literatura. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81(3): 251-4.
107. Abdo EM, Garrocho AA, Aguiar MCF. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. *Rev Bras Cancerol.* 2002; 48(3): 357-62.
108. Carli et al. Características Clínicas, Epidemiológicas e Microscópicas do Câncer Bucal Diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. *Rev Bras Cancerol.* 2009; 55(3): 205-211.
109. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(3): 229-39.

110. Vidal AKL. et al. HPV detection in oral carcinomas . J Bras Patol Med Lab. 2004; 40(1): 21-6.
111. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol.1992; 166(4): 375-81.
112. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. Ann N Y Acad Sci. 1956; 63:1245-61.
113. Moscona A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1957 jan; 43(1): 184-194.
114. Halpern B, et al. Differences in Patterns of Aggregation of Malignant and Non- Malignant Mammalian Cells. Nature, 1966; 209 (5019): 157-159.
115. Sutherland RM, et al. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J. Natl Cancer Inst. 1971; 46: 113-120.

ANEXO A – PROTOCOLO DE ATENDIMENTO

Nº REGISTRO _____

DATA DE COLETA ____/____/____

ANAMNESE**1 - IDENTIFICAÇÃO**

Iniciais do nome _____

Gênero: ____ Cor: _____ Idade: ____ Data de Nascimento: ____/____/____

Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____

Profissão: _____ Estado Civil: _____

Endereço/ Tempo de moradia: _____

2 - MOTIVO

3 - HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

4 - HÁBITOS

Fuma? (1) Não (2) Sim

Quanto tempo? (1) 0 a 10 anos (2) 10 a 20 anos (3) 20 a 30 anos

(4) 30 a 40 anos (5) 40 a 50 anos (6) 50 a 60 anos

Tipo(s) _____

Bebe? (1) Não (2) Sim

Frequência? (1) 1 vez ao dia (2) 2 vezes ao dia (3) 3 ou mais vezes ao dia

Tipo _____

Trabalho sob sol? (1) Não (2) Sim

Quanto tempo? (1) 0 a 5 anos (2) 5 a 10anos (3) 10 a 20 anos

(4) 20 a 30 anos (E) 30 a 40 anos (5) Mais 40 anos

Risco de trabalho? (1) Sim (2) Não

Alimentação: tipo: (1) Vegetariano (2) Carnívora (3) Mista

Frequência: (1) 1 vez dia (2) 2 vezes dia

(3) 3 vezes dia (4) 4 ou mais

Habitação: Tipo de casa, Metros quadrados, _____

Saneamento: (1) água potável (2) área rural (3) área urbana

Coabita com animais: (1) Sim (2) Não

Vacinados ? (1) sim (2) não

Quais? _____

Viagens para áreas endêmicas ? (1) Sim (2) Não

Qual ? _____

Comportamento sexual: heterossexual (1) homossexual (2) outro (3)

Lazer: Sim (1) Não (2) Qual? _____

5 - HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA

Transfusão sanguínea: (1) Sim (2) Não

Doação de órgãos : (1) sim (2) não

Lesão genitália : (1) sim (2) não

Local _____

6 - HISTÓRIA FAMILIAR

7 - TRATAMENTO MÉDICO ATUAL

8 - EXAME FÍSICO**8.1 - CADEIAS LINFÁTICAS**

(1) occipital, (2) auricular posterior, (3) auricular anterior,
(4) submandibulares, (5) submentoniana, (6) cervicais

OBS: _____

8.2 - INTRA-BUCAL

(1) lábios, (2) mucosa jugal, (3) área retromolar, (4) palato duro,
(5) palato mole (6) língua: (a) dorso, (b) ventre, (c) bordas (d) base
(e) assoalho da boca, (f) gengiva (g) orofaringe

OBS: _____

9 - LESÃO

Local: _____ Cor: _____ Forma: _____

Tamanho: _____ Volume: _____ Superfície: _____

Consistência: _____

Sintomatologia: _____

OBS: _____

10 - DIAGNÓSTICO CLÍNICO PRESUNTIVO: _____

11 - EXAMES COMPLEMENTARES PARA DIAGNÓSTICO:

Radiográfico (Tipo(s)): _____

Hematológicos/ Bioquímicos (Tipo(s)): _____

Cito/ Histopatológicos (Tipo(s)): _____

CONDUTA ADOTADA (Orientação/ Medicação/ Solicitação de Exames)

Encaminhamento(s))

Especificar : _____

Brasília, _____ / _____ / _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto: Estudo clínico, molecular e epidemiológico da infecção pelo HPV em pacientes com neoplasia de cavidade oral e orofaringe da Secretaria de Saúde do DF. O nosso objetivo é buscar novas alternativas para colaborar com tratamento futuro de doenças neoplásicas que acometem pacientes suspeitos de contaminação por HP.

O(a) Senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação será através de um questionário que você deverá responder no setor da Unidade de Odontologia do HRAN/SES na data combinada com um tempo estimado para seu preenchimento de 15 minutos. Não existe, obrigatoriamente, um tempo pré-determinado para responder ao questionário. Sendo respeitado o tempo de cada um para respondê-lo. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder a qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o(a) Senhor(a) no seu entendimento.

Os resultados da pesquisa serão divulgados aqui no Setor da Unidade de Odontologia do HRAN/SES e para todo o Hospital Regional da Asa Norte, podendo, inclusive, ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do Setor da Unidade Odontológica do HRAN/SES.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, telefone para Dr. Eliziário Cesar de Vasconcelos Leitão, na instituição Hospital Regional da Asa Norte, telefones 3325-4205 ou 3325-4305, no horário das 8 às 11h e das 14 às 17h.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do SES/DF. Qualquer dúvida em relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa, podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955.

Este documento foi elabora em duas vias. Uma ficará com o pesquisador responsável e a outra, com o sujeito da pesquisa.