UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Régia Caroline Peixoto Lira

*Avaliação da expressão de BubR1 em carcinomas orais de células
escamosas e lesões orais benignas associadas à infecção pelo
Papilomavírus humano (HPV)*

Ribeirão Preto
2009

RÉGIA CAROLINE PEIXOTO LIRA

***Avaliação da expressão de BubR1 em carcinomas orais de células
escamosas e lesões orais benignas associadas à infecção pelo
Papilomavírus humano (HPV)***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia Soares

Ribeirão Preto
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Lira, Régia Caroline Peixoto

Avaliação da expressão de BubR1 em carcinomas orais de células escamosas e lesões orais benignas associadas à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Ribeirão Preto, 2009.

133p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Patologia.

Orientador: Soares, Edson Garcia.

1. Carcinoma oral. 2. HPV. 3. BubR1

FOLHA DE APROVAÇÃO

Régia Caroline Peixoto Lira

Avaliação da expressão de BubR1 em carcinomas orais de células escamosas e lesões orais benignas associadas à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área: Patologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico minha dissertação de mestrado às minhas mães **Maria de Lourdes P. de Omena**, **Arlinda Maria P. de Omena** e as duas **Marias das Graças P. de Omena** (tia e avó), grandes incentivadoras dos meus estudos, conselheiras, educadoras e exemplos de vida.*

Minha eterna gratidão pelo apoio, pelo carinho, por todos os ensinamentos e pelo imenso amor que me têm.

Vocês são o estímulo e força que nunca me faltaram.

Amo muito cada uma de vocês.

Agradecimientos

Ao *Ser Superior*, por todos os fatos inexplicavelmente maravilhosos que acontecem em minha vida e pela linda família que possuo.

Ao meu *pai (Reginaldo Souza Lira)* pelo incentivo, educação e carinho que sempre me deu, principalmente durante minha formação como pessoa.

Ao *Prof. Edson Garcia Soares*, que me abriu as portas para a pesquisa e para o mundo humanístico. Muito mais do que orientador e mestre, um pai-amigo, conduzindo-me para o conhecimento e crescimento tanto profissional quanto pessoal. Você acolheu esta alagoana “maluca” de maneira destemida, desde o primeiro dia. Serei eternamente grata por tudo. De coração, muito obrigada!

À grande amiga *Ana Maria da Rocha*, pela amizade, paciência e excelente auxílio técnico e científico. Muito obrigada pelos ensinamentos e, principalmente, pelo carinho e acolhimento que sempre tive.

À *Profa. Christiane Pienna Soares*, pela indispensável assessoria científica.

Aos *Professores Eduardo Antônio Donadi e Aguinaldo Simões*, pela colaboração, auxílio científico e gentileza em ceder espaço para a realização das técnicas de biologia molecular.

Aos amigos de departamento *Fabiana de Camargo, Márcia Preti, Marcela Hassumi, Vinícius Kannen, Viviane Oliveira, Elder Latorraca, Mariângela Brunaldi, Érica Campos e Mara Celes* pelo apoio, incentivo e pela amizade sincera. De maneira direta ou indireta vocês contribuíram para a realização de um sonho, pois nos momentos das adversidades, sempre pude contar com vocês.

Às queridas amigas **Renata Simões** e **Jussara Bettini** pelo apoio científico e disponibilidade. Obrigada também pela enorme paciência que tiveram comigo.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, **Neide Terezinha Gonçalves Rosângela M. Castania de Paiva, Camila de Luca Zambonini, Edna Pio da Silva (in memorian), Deise Lúcia Simões, Rosângela Orlandin Lopes e Antônio de Pádua** pela amizade e carinho oferecidos em todos os momentos do meu mestrado.

À minha grande amiga e companheira **Tassiana Marini** pela ternura, generosidade, paciência e apoio. Você se tornou o meu “amorr”, minha irmãzinha de coração. Obrigada mesmo.

Às eternas amigas **Ernna Hérída** (meu primeiro amorrr), **Monique Tonani** e **Mariana de Souza** (minha primeira companheira) pela grande amizade construída e pelos maravilhosos e inesquecíveis momentos compartilhados.

Ao meu lindo **Lucas Volgarini** e sua acolhedora família pelo apoio constante, paciência e carinho durante os momentos mais críticos do meu mestrado.

Aos amigos **Benísio Ferreira da Silva Filho** e **Gustavo Reis Branco de Souza** por terem despertado em mim a vontade de fazer pesquisa. Nunca esquecerei a maneira sutil como fui convidada para fazer parte do grupo de iniciação científica. Serei eternamente grata pela amizade e por tudo o que cresci com vocês.

À **Profa. Maria Lusia de Moraes Belo** (orientadora de iniciação científica) pelo incentivo e colaboração direta no meu crescimento profissional. Muito do que aprendi sobre pesquisa científica eu devo a você. Muito obrigada.

Aos funcionários do arquivo do Serviço de Patologia do HC (SERPAT) **Décio A. Barrionovo Filho** e **César Alberto Brigato Jr** pela amizade sincera, pela compreensão e ajuda em todos os momentos.

Às técnicas de laboratório **Ana Lúcia Pimentel** (Departamento de genética) e **Sandra Silva Rodrigues dos Santos** (Laboratório de biologia molecular) pela paciência, acolhimento e, principalmente, pela amizade e auxílio em todas as dificuldades.

À **CAPES** pelo auxílio científico e financeiro.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar".

(Anatole France)

Resumo / Abstract

LIRA, R.C.P. **Avaliação da expressão de BubR1 em carcinomas orais de células escamosas e lesões orais benignas associadas à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV).** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área: Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC – *Oral Squamous Cell Carcinoma*) é o câncer de cabeça e pescoço mais comum. Somente no Brasil, foram estimados 14.160 novos diagnósticos para o ano de 2009. O HPV está associado com o aumento no risco do câncer oral, mas seu papel na carcinogênese ainda é controverso. A BubR1, uma proteína importante para o *checkpoint* de fuso mitótico (*SAC – Spindle Assembly Checkpoint*), tem sido associada com algumas proteínas codificadas por espécies virais e com o câncer. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de BubR1 em lesões orais benignas e amostras de OSCC com e sem metástase associadas com infecção pelo HPV. Nós realizamos imunoistoquímica para BubR1 em 16 biópsias de lesão oral benigna e em 70 biópsias de OSCC divididas em três grupos (tumores *in situ*, tumores invasivos sem metástase e tumores invasivos com metástase), com os respectivos linfonodos das amostras com metástase. A técnica de *Nested* PCR foi realizada com finalidade de detectar DNA do HPV. Nas lesões malignas, foi observada uma significativa superexpressão de BubR1 associada com menor sobrevida ($p = 0.0479$). Houve também correlação significativa ($r = 1.000$) de BubR1 entre as lesões com metástase e seus respectivos linfonodos. Noventa por cento dos OSCC e 100% das lesões benignas foram HPV positivos. HPV 16 e HPV 18 foram detectados em, respectivamente, 13% e 24% das amostras com OSCC HPV-positivas. O HPV teve maior prevalência (76%) nas amostras com alta expressão de BubR1 e a ausência de DNA viral não influenciou no padrão de expressão de BubR1. Esses resultados sugerem uma provável associação do HPV com a superexpressão de BubR1 em OSCC, o que não se aplica para lesões orais benignas.

Palavras-chaves: BubR1, HPV, Carcinoma oral de células escamosas.

LIRA, R.C.P. **Evaluation of BubR1 expression in oral squamous cell carcinomas and benign oral lesions associated with human Papillomavirus (HPV) infection** 2009. Dissertation (Master's degree in Science. Area: Pathology) – *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo*.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common head and neck cancer. Only in Brazil, the estimate is that 14,160 new diagnoses will be made in 2009. HPV is associated with increasing risk of oral cancer, but its role in carcinogenesis is still controversial. BubR1, an important protein in the mitotic Spindle Assembly Checkpoint (SAC), has been associated with some virus-encoded proteins and cancer. The aim of the present study was to evaluate the expression of BubR1 in non-malignant oral lesions and OSCC with and without metastasis associated with HPV infection. We performed immunohistochemistry for BubR1 in 16 non-malignant oral lesion biopsies and in 70 OSCC biopsies divided into three groups (*in situ* tumors, invasive tumors without metastasis and invasive tumors with metastasis) with their respective lymph nodes from samples with metastasis. Nested PCR was performed in order to detect HPV DNA. Significantly higher BubR1 expression associated with shorter survival ($p = 0.0479$) was observed in malignant lesions. There was also a significant correlation ($r = 1.000$) with BubR1 expression in lesions with metastasis and their lymph nodes. Ninety percent of OSCC and 100% of benign lesions were HPV positive. HPV 16 and HPV 18 were present in 13% and 24% of HPV-positive OSCC samples, respectively. HPV was more prevalent (76%) in samples with high BubR1 expression and the absence of viral DNA had no influence on BubR1 expression. These findings suggest that HPV could be associated with overexpression of BubR1 in OSCC, but not in benign oral lesions.

Key Words: BubR1, HPV, Oral squamous cell carcinoma.

Listas

Abreviaturas e Siglas

ABC	<i>Avidin Biotin Complex</i> (Complexo Avidina Biotina)
APC/C	<i>Anaphase - promoting Complex / Cyclosome</i> (Complexo / Ciclossomo Promotor da Anáfase)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Bub	<i>Budding uninhibited by benzimidazole</i>
BubR1	<i>Bub1 - related protein</i>
CDKs	<i>Cyclin - dependent Kinases</i> (Cinases Ciclino - dependentes)
Cenp-E e F	<i>Centromere protein E and F</i> (Proteína do centrômero E e F)
CKIs	<i>Cyclin - dependent Kinases Inhibitors</i> (Inibidores das Cinases Ciclino - dependentes)
Cdc20	<i>Cell - division - cycle 20 homologue</i>
CMT2	<i>Caught by Mad2 Protein</i>
DAB	Diaminobenzidina
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
EBNA3C	<i>Epstein - Barr virus nuclear antigen 3C</i> (Antígeno nuclear 3C do vírus Epstein Barr)
EBV	<i>Epstein - Barr virus</i>
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal)
EP	Erro Padrão
Fas	Receptor de superfície celular que pertence a um subgrupo da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF-R)
GAP	Tipo de junção celular formado por canais transmembrana que ligam compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas
HBx	Proteína X do Vírus da Hepatite B

HCFMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HeLa	Linhagem celular imortal utilizada para pesquisa científica
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
Hsp40 e Hsp70	<i>Heat - shock protein 40 e 70</i> (Proteína de choque térmico 40 e 70)
HTLV 1	<i>Human T lymphotropic virus type 1</i> (Vírus T-linfotrópico Humano tipo 1)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisas do Câncer)
IC	Intervalo de confiança
ICD	<i>International Classification of Diseases</i> (Classificação Internacional das Doenças)
KS	<i>Kolmogorov-Smirnov</i>
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)
LN	Linfonodo
LO^B	Lesão oral benigna
M	Média aritmética; Mitose
Mad	<i>Mitotic arrest deficient</i>
MAP-cinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteína - cinases ativadas por mitógenos)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mps1	<i>Monopolar spindle 1</i>
NCR	<i>Noncoding Region</i> (Região não-codificante)
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro de Leitura Aberta)
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i> (Carcinoma Oral de Células Escamosas)
OSCC^{IS}	Carcinoma Oral de Células Escamosas <i>in situ</i>
OSCC^M	Carcinoma Oral de Células Escamosas invasor com metástase
OSCC^S	Carcinoma Oral de Células Escamosas invasor sem metástase

pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
Pds1	Securina
PLKs	<i>Polo-like Kinases</i> (Cinases pólo-semelhantes)
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
pRb	Proteína Retinoblastoma
RPA	<i>Replication Protein A</i> (Proteína de Replicação A)
ROD	Proteína <i>Rough Deal</i>
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i> (Ponto de checagem da montagem do fuso mitótico)
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SERPAT	Serviço de Patologia
SP1	<i>Promoter-specific transcription factor</i> (Fator de transcrição promotor - seletivo 1)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TNM	Classificação de tumores malignos onde T representa o tamanho do tumor, N os linfonodos envolvidos e M metástase
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand</i> (Ligante indutor de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral)
Transversão G:T	Tipo de mutação onde há troca do nucleotídeo Guanina pela Timina
TXBP181	<i>Tax1 - binding Protein</i> , também chamada MAD1L1
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória <i>Upstream</i>)
Ub	Ubiquitina
UV	Ultra violeta
ZW10	Proteína <i>Zeste - White 10</i>
Zwilch	Proteína localizada no cinetócoro que age de maneira idêntica às proteínas ZW10 e ROD

Figuras

Figura 1 -	Partícula viral não envelopada (vírion)_____	30
Figura 2 -	Estrutura do genoma e mapa transcricional do HPV 16_____	31
Figura 3 -	Representação do Genoma do HPV 16_____	32
Figura 4 -	Representação esquemática da diferenciação epitelial anormal induzida por infecção pelo HPV_____	33
Figura 5 -	Posicionamento dos cinetócoros durante as principais fases que participam do <i>checkpoint</i> mitótico_____	41
Figura 6 -	Mecanismo de funcionamento do <i>checkpoint</i> de fuso mitótico_____	42
Figura 7 -	A disposição dos domínios protéicos de BubR1 em <i>Xenopus</i> _____	44
Figura 8 -	Representação da idade média de todos os pacientes com carcinoma oral, organizados de acordo com o tipo de lesão e sexo_____	62
Figura 9 -	Representação da porcentagem de pacientes tabagistas e consumistas de bebidas alcoólicas de acordo com o tipo de lesão_____	62
Figura 10 -	Expressão de BubR1 determinada pela reação de imunoistoquímica_____	65
Figura 11 -	Média de células marcadas com BubR1 de acordo com o tipo de lesão oral avaliada_____	67
Figura 12 -	Eletroforese da reação em cadeia da polimerase (PCR) em gel de poliacrilamida 10%_____	70
Figura 13 -	Representação da expressão de BubR1 de acordo com a presença de HPV nos carcinoma orais de células escamosas_____	71
Figura 14 -	Sobrevida acumulada de acordo com a expressão de BubR1_____	74
Figura 15 -	Sobrevida acumulada dos 23 pacientes com linfonodos metastáticos de acordo com a expressão de BubR1_____	74
Figura 16 -	Sobrevida acumulada de acordo com a presença de HPV nas lesões_____	75
Figura 17 -	Sobrevida acumulada de acordo com o tipo de HPV nas lesões_____	76
Figura 18 -	Sobrevida acumulada dos pacientes com linfonodos positivos para HPV, de acordo com os tipos virais detectados nos linfonodos_____	76
Figura 19 -	Curvas de sobrevida livre da doença de acordo com o padrão de expressão de BubR1_____	77

Tabelas

Tabela 1 -	Característica das regiões regulatórias (ORFs) do HPV_____	34
Tabela 2 -	Proteínas do <i>checkpoint</i> mitótico_____	41
Tabela 3 -	Parâmetros clínicos dos 86 pacientes avaliados de acordo com sexo, idade e exposição ao tabaco e álcool_____	61
Tabela 4 -	Parâmetros clínicos de todos os pacientes com câncer versus pacientes sem câncer oral e entre os diferentes grupos de carcinoma de células escamosas oral_____	63
Tabela 5 -	Correlação entre a expressão qualitativa de BubR1 e os parâmetros clínico-patológicos nas amostras de carcinoma oral avaliadas_____	66
Tabela 6 -	Comparação da expressão quantitativa de BubR1 em carcinomas orais <i>versus</i> lesões orais benignas_____	68
Tabela 7 -	Prevalência de HPV nas lesões orais benignas e malignas_____	69
Tabela 8 -	Prevalência do HPV nos carcinomas orais de acordo com a expressão de BubR1_____	72
Tabela 9 -	Comparação das médias de células marcadas nos casos positivos para HPV com alta e baixa expressão de BubR1_____	73

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Aspectos epidemiológicos do câncer oral	24
1.2. Etiologia do câncer oral	25
1.2.1. Tabaco	26
1.2.2. Álcool	27
1.2.3. Papilomavírus Humano (HPV)	28
1.3. A biologia do HPV	30
1.3.1. Estrutura e o genoma viral	30
1.3.2. A replicação viral	32
1.3.3. As proteínas da região E do genoma viral	34
1.3.4. Classificação dos Papilomavírus	37
1.4. O Checkpoint de fuso mitótico	38
1.4.1. A relação entre proteínas virais com o checkpoint mitótico	43
1.5. A proteína BubR1	44
1.5.1. BubR1 no câncer	45
2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos	48
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
3.1. Aspectos Éticos	50
3.2. Amostras	50
3.3. Reação de imunoistoquímica para BubR1	51
3.4. Avaliação qualitativa de BubR1	53
3.5. Aquisição das imagens e avaliação quantitativa de BubR1	53
3.6. Detecção e Tipagem do HPV	54
3.6.1. Extração de DNA genômico de tecido parafinado	54
3.6.2. Amplificação do gene da beta-globina e da região consenso do HPV	55
3.6.3. Amplificação com iniciadores tipo específico HPV 16 e HPV 18	56
3.6.4. Controles	57
3.6.5. Separação eletroforética e análise do produto amplificado	57
3.7. Análises estatísticas	58
4. RESULTADOS	60

<i>4.1. Lesões orais e parâmetros clínicos</i>	61
<i>4.2. Expressão qualitativa de BubR1 e parâmetros clínico-patológicos</i>	64
<i>4.3. Expressão quantitativa de BubR1 nas lesões orais</i>	67
<i>4.4. Detecção do HPV e sua correlação com a expressão de BubR1</i>	68
<i>4.5. Análise de sobrevivência</i>	73
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	108
<i>Anexo A (Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa)</i>	109
<i>Anexo B (Reagentes e Soluções para Imunoistoquímica)</i>	110
<i>Anexo C (Soluções e Protocolo para Extração de DNA)</i>	112
<i>Anexo D (Reagentes e Soluções para Eletroforese)</i>	115
<i>Anexo E (Artigo científico enviado para publicação)</i>	117

1. Introdução

1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer oral

O câncer oral é um subgrupo das neoplasias malignas de cabeça e pescoço que, de acordo com os códigos da Classificação Internacional das Doenças versão 9 (*International Classification of Diseases – ICD*), desenvolve-se em várias regiões da cavidade oral, representadas pelos seguintes códigos: (140) lábios, (141) língua, (143) gengiva, (144) assoalho da boca e (145) outros locais não específicos. As principais glândulas salivares (142), orofaringe (146) e nasofaringe (147) não são incluídas (Worrall, 2001). O carcinoma oral de células escamosas (*Oral Squamous Cell Carcinoma – OSCC*) é o tipo de câncer mais comum de cabeça e pescoço, ocupando o oitavo lugar na incidência mundial (Arduino *et al.*, 2008; Scully e Bagan, 2009). A estimativa anual é de mais de 170.000 novos casos em homens e mais de 98.000 em mulheres com mais de um milhão de mortes relacionadas (Ferlay *et al.*, 2004). Sua incidência varia de acordo com a região analisada, sendo que em algumas partes do mundo os números de casos têm aumentado (Tsantoulis *et al.*, 2007).

Somente no Brasil, foram estimados 14.160 novos diagnósticos para o ano de 2009 (INCA, 2007). Nos Estados Unidos foram estimados 15.250 homens e 7.650 mulheres com diagnóstico de câncer na cavidade oral só para o ano de 2008. Em alguns países europeus a incidência desta doença tem aumentado, porém na Itália e França se observa um decréscimo no número de homens acometidos por este tipo de câncer. Por outro lado, houve um aumento no número de mulheres com câncer oral na França, Alemanha e Reino Unido (Curado e Hashibe, 2009). Na Índia, este tipo de neoplasia representa mais da metade de todas as neoplasias malignas diagnosticadas no país, o que pode ser atribuído a influência de fatores carcinógenos regionais como o hábito de mascar folhas de betel (Tsantoulis *et al.*, 2007). No Brasil, no período entre 1979 e 2002, foram registradas 38.263 mortes por câncer oral, com uma proporção entre homem : mulher de 4:1 (Boing, Peres e Antunes, 2006). Somente no distrito de São Paulo, de acordo com o Registro de Câncer de São Paulo, entre os anos de

1997 e 1999, 511 homens e 133 mulheres morreram devido a câncer na cavidade oral e a proporção de casos diagnosticados que evoluem para óbito varia entre 27% a 50% no mesmo distrito (Menezes, Lehn e Goncalves, 2007).

O câncer oral afeta, predominantemente, pacientes com baixas condições socioeconômicas (Walker, Boey e McDonald, 2003; Scully e Bagan, 2009), que em sua maioria possui déficit educacional, pouca higiene oral e limitada assistência médico-odontológica (Massano *et al.*, 2006), levando assim a uma maior incidência nos países em desenvolvimento (Carvalho *et al.*, 2004). O OSCC acomete mais homens adultos acima de 40 anos, numa proporção homem:mulher entre 1.3:1 e 2:1 em todo o mundo (Worrall, 2001; Scully e Bagan, 2007), sendo diagnosticado geralmente após os 60 anos de idade (Goldenberg, Brooksby e Hollenbeak, 2009).

1.2 Etiologia do câncer oral

A patogênese do carcinoma de células escamosas é multifatorial. O tabagismo crônico e o alcoolismo crônico são considerados fatores ambientais que predisõem ao desenvolvimento deste tipo de câncer por provocar danos oxidativos ao DNA (Khalili, 2008). A radiação actínica (luz do sol) (Perea-Milla Lopez *et al.*, 2003) e particularmente, o hábito de fumar cachimbo, também estão associados com o câncer de lábio inferior (Hindle, Downer e Speight, 2000). No entanto, alguns pacientes desenvolvem carcinoma oral de células escamosas sem qualquer exposição com álcool ou tabaco. Isso sugere que causas adicionais podem tornar os indivíduos mais suscetíveis como: predisposição genética, alterações imunológicas, presença de variantes oncogênicas de vírus como o Papilomavirus Humano (*Human Papillomavirus* - HPV), histórico familiar de câncer de cabeça e pescoço e dieta alimentar (Walker, Boey e McDonald, 2003; Nemes *et al.*, 2008).

1.2.1 Tabaco

Em 1957, Wynder e Bross identificaram o consumo de cigarros como fator de risco independente para o desenvolvimento do câncer de boca. Algum tempo depois, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) confirmou que as várias formas de tabaco (cigarros, charutos, cachimbos, etc) têm propriedades carcinogênicas (IARC, 1986). São encontrados no tabaco cerca de 300 carcinógenos e pró-carcinógenos, incluindo nitrosaminas, aldeídos, aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que podem induzir mutações específicas, particularmente transverso G:T (Walker, Boey e McDonald, 2003). Muitos desses componentes têm a capacidade de formar ligações com o DNA, sendo que fumantes apresentam uma maior quantidade de ligações e de quebras no DNA em tecidos da cavidade oral do que não fumantes (Phillips, 2002), além disso, a capacidade de reparo de danos no DNA causados por carcinógenos do tabaco está deficiente em alguns pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Cheng *et al.*, 1998). O hábito de fumar leva a mudanças na mucosa oral, uma vez que a peroxidase presente na saliva fica exposta ao cianeto contido no cigarro, ocorrendo então uma rápida destruição desta enzima e de outras proteínas que protegem a cavidade oral das espécies reativas de oxigênio e da proliferação bacteriana (Nagler e Dayan, 2006). Sendo assim, tabagistas pesados são mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões orais e OSCC do que indivíduos não tabagistas (Napier e Speight, 2008), havendo uma forte relação entre o número de cigarros consumidos por dia, o tempo de exposição ao mesmo e a carcinogênese oral (Muwonge *et al.*, 2008).

O hábito de mascar folhas de betel, antes de relevância apenas no sudeste asiático e na Índia, mas atualmente com uma estimativa de mais de 600 milhões de consumidores em todo o mundo (Nelson e Heischouer, 1999; Warnakulasuriya, 2002), também foi considerado pela IARC como um agente carcinogênico para a cavidade oral (IARC, 2004). Sundqvist e

Grafstrom (1992) observaram que, as substâncias extraídas da noz de betel ou formada na saliva devido o seu uso induzem alterações na morfologia, crescimento e diferenciação de células normais, assim como dano ao DNA. A arecolina, principal alcalóide da noz de betel (noz de areca), possui a capacidade de hipermetilar genes supressores tumorais tal como p53, reprimir o reparo do DNA e com isso desencadear danos no DNA de células epiteliais humanas (Scully e Bagan, 2009). Além das folhas de betel, a maconha (*Cannabis sativa*) foi associada com lesões orais pré-malignas e câncer de cabeça e pescoço em pessoas abaixo de 50 anos. No entanto, seu efeito carcinogênico ainda é bastante controverso. O provável mecanismo, pelo qual a maconha pode desencadear lesões neoplásicas, está relacionado à presença de muitos dos carcinógenos e pró-carcinógenos do tabaco comum, porém em quantidades 50% mais elevadas (Hashibe *et al.*, 2005; Versteeg *et al.*, 2008).

1.2.2 Álcool

As bebidas alcoólicas também contêm muitos carcinógenos e pró-carcinógenos, incluindo o etanol e as nitrosaminas. O acetaldeído, o primeiro metabólito do etanol, é citotóxico e carcinogênico, levando à produção de radicais livres e bases hidroxiladas no DNA. Existe uma clara evidência de que pacientes com câncer oral apresentam maior dano no DNA do que pessoas com hábitos similares de consumo de álcool e fumo, mas sem neoplasia (Scully, 2000.). Em mais de 50% dos pacientes diagnosticados com OSCC é constatada história clínica de consumo de álcool, sendo que o consumo diário acima de 100g aumenta em 30 vezes as chances de desenvolver carcinoma oral do que aquelas que ingerem menos de 15g diariamente (Kademani, 2007). Um estudo prospectivo envolvendo mais de 50 000 homens americanos concluiu que o consumo de álcool, independente do tipo ou padrão de ingestão, é um fator de risco isolado no desenvolvimento de lesões orais pré-malignas (Maserejian *et al.*, 2006). Atualmente uma revisão de literatura avaliou as evidências epidemiológicas que

suportam o papel do álcool no desenvolvimento do carcinoma oral e observou que o uso de antissépticos bucais contendo álcool pode contribuir na carcinogênese oral (McCullough e Farah, 2008).

O álcool possui a capacidade de eliminar o componente lipídico que constitui a barreira presente na cavidade oral que envolve a camada epitelial e, em curto prazo, a exposição também aumenta a permeabilidade da mucosa ventral da língua (McCullough e Farah, 2008). Apesar da maior parte do metabolismo do álcool ser realizado no fígado, existem evidências da participação da mucosa oral no metabolismo extra-hepático (Dong, Peng e Yin, 1996). Sendo assim, o padrão de expressão de determinadas enzimas associado ao tipo de flora bacteriana presente na boca influi significativamente nos níveis de acetaldeído após a ingestão de álcool, o que contribui para um maior risco de desenvolver carcinoma oral (Seitz *et al.*, 2001; Kurkivuori *et al.*, 2007). Recentemente, Warnakulasuriya *et al.* (2008) mostraram fortes evidências do potencial carcinogênico do álcool através do padrão de expressão imunoistoquímica de proteínas do DNA ligadas covalentemente ao acetaldeído e de produtos da peroxidação lipídica.

1.2.3 Papilomavírus Humano (HPV)

Outro agente etiológico que vem sendo considerado relevante no desenvolvimento do câncer oral, além do tabaco e do álcool, é o HPV (Nagpal e Das, 2003). O somatório da infecção viral com deficiência imunológica e exposição a pró-carcinógenos químicos ou físicos favorece o desenvolvimento do câncer oral (Llewellyn, Johnson e Warnakulasuriya, 2001; Miller e Johnstone, 2001). O HPV promove o descontrole do ciclo celular e sua relação com o câncer oral foi primeiramente relatada por Syrjanen *et al.* (1983). Desde então muitos trabalhos têm confirmado de maneira cada vez mais consistente esta associação (McGlennen, 2000; Sand *et al.*, 2000; Scully e Bedi, 2000; Scully, Field e Tanzawa, 2000).

A presença do genoma do HPV em carcinoma oral de células escamosas tem sido relatada em várias porcentagens e padrões genotípicos. Muitos dos relatos propõem que determinados tipos de HPV estão associados com maior risco de câncer cervical e de transformação maligna das células mais indiferenciadas (*stem cells*) da mucosa oral (Nemes *et al.*, 2006). Estudos realizados no Brasil demonstram a presença de HPV em lesões benignas e malignas de mucosa oral com positividade variando de 15-60%, sendo que a infecção com os tipos oncogênicos tais como 16 e 18 tem sido descrita em cerca de 20 a 30 % das lesões orais pré-malignas e neoplásicas (Miguel *et al.*, 1998; Giovannelli *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2002a; Soares *et al.*, 2002b; Fregonesi *et al.*, 2003; Ostwald *et al.*, 2003b; Soares *et al.*, 2003; Sugiyama *et al.*, 2003). Um estudo multicêntrico realizado em vários países, dentre os quais, Itália, Espanha, Cuba, Canadá, Austrália, Índia e Irlanda do Norte, detectou um baixo índice de HPV em boca (3,9%), mas uma considerável incidência em orofaringe (18,3%) (Herrero *et al.*, 2003).

A ligação entre o HPV e câncer oral ainda não está totalmente esclarecida, pois os resultados de muitos dos estudos são contraditórios (Rivero e Nunes, 2006). Deve-se considerar que alguns estudos possuem certas limitações como: o baixo número de cópias virais nos casos OSCC, metodologias para detecção viral com diferentes sensibilidades e especificidades, a falta de controles adequados, a presença de fatores que podem confundir os resultados e o pequeno número de amostras (Miller e Johnstone, 2001). As ferramentas moleculares utilizadas na pesquisa do HPV podem envolver hibridização direta com investigação de DNA complementar (*Southern blotting* ou hibridização *in situ*); amplificação de sinal, a exemplo da captura híbrida; ou amplificação de ácido nucléico pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). A PCR é considerada o método mais sensível para detectar o DNA de HPV em amostras clínicas e pode ser executada utilizando iniciadores gerais que detectam uma região comum a todos os tipos de HPVs ou

iniciadores específicos para cada tipo viral (Rivero e Nunes, 2006; Luo, Roan e Liu, 2007).

1.3 A biologia do HPV

1.3.1 Estrutura e genoma viral

O Papilomavírus Humano é um vírus da família *Papovaviridae*, que possui tropismo por células epiteliais de pele e mucosa. Este pequeno vírus de DNA possui suas partículas virais constituídas basicamente por um capsídeo protéico icosaédrico de 55nm de diâmetro não envelopado. No interior do capsídeo, seu genoma é formado por DNA circular dupla fita que mede entre 7200 e 8000 pares de bases (pb) e está associado com histonas celulares, formando estruturas semelhantes à cromatina (**Figura 1**) (Pfister e Fuchs, 1994; Doorbar, 2005). De forma geral, o genoma do HPV contém 10 fragmentos de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs) distribuídos em três principais regiões: região precoce (*Early* - E), região Tardia (*Late* - L) e uma região não-codificante (*Noncoding Region* - NCR) denominada região de controle longa (*Long Control Region* - LCR) ou região regulatória acima (*Upstream Regulatory Region* - URR) (Zheng e Baker, 2006; Conway e Meyers, 2009).

Figura 1 - Partícula viral não envelopada (vírion). Capsídeo icosaédrico com aproximadamente 52-55 nm de tamanho protegendo uma molécula circular de DNA dupla fita (Swiss Institute of Bioinformatics, 2009).

Sabe-se que a região E, responsável por mais de 50% do genoma viral, possui oito (ORFs), sendo que seis (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam proteínas regulatórias não-estruturais em células indiferenciadas ou com diferenciação intermediária. Os ORFs E3 e E8 também pertencem à região E, mas apenas o E8 tem função conhecida e codifica uma proteína gerada a partir de um *splicing* E8^{E2C}, que funciona como regulador negativo da transcrição e replicação viral em Papilomavírus Bovino (BHP) e HPV 31 (Heise, 2003; Zheng e Baker, 2006). A partir da região L no genoma de células em fase terminal de diferenciação são traduzidas duas proteínas estruturais do capsídeo viral (L1 e L2) (Zheng e Baker, 2006). Esta última região engloba 40% do genoma e é constituída por seqüências altamente conservadas entre todos os HPVs, respondendo por sua antigenicidade (**Figuras 2 e 3**) (Zur Hausen, 2002; De Villiers *et al.*, 2004).

Figura 2 – estrutura do genoma e mapa transcricional do HPV 16. A faixa na parte mais inferior do esquema representa a forma linear do genoma viral, indicando os promotores (setas) e os sítios de poliadenilação PAE e PAL. Os ORFs (caixas abertas) estão representados com números acima das caixas, indicando a posição do primeiro nucleotídeo do códon de início e com último nucleotídeo dos códons de parada no genoma do HPV 16. O ORF E4 requer *splicing* de RNA (linhas tracejadas) (Zheng e Baker, 2006).

Figura 3 – Genoma do HPV 16 (7904 bp) representado pelo círculo preto com os promotores precoce (p97) e tardio (p670) identificados pelas setas. Os seis ORFs da região E [E1, E2, E4 e E5 (em verde) e E6 e E7 (em vermelho)] são expressos tanto pelo p97 como pelo p670 em diferentes estágios da diferenciação da célula epitelial. Os ORFs tardios [L1 e L2 (em laranja)] também são expressos a partir do p670, seguindo um padrão de *splicing* diferente e uma mudança no local utilizado para poliadenilação [do sítio precoce (PAE) para o tardio (PAL)]. Todos os genes virais estão codificados em uma fita do DNA genômico. A região da origem de replicação (LCR desde o nucleotídeo 7156 ao 7184) está aumentada para melhor visualização dos sítios de ligação da E2 e do elemento TATA do promotor p97. Os sítios de ligação da E1 e SP1 também estão representados (Doorbar, 2006).

1.3.2 A Replicação viral

A origem da replicação do HPV está localizada na região LCR, representa cerca de 10% do genoma viral e está localizada entre as ORFs L1 e E6, com aproximadamente 500 a 1000pb. A transcrição inicia-se a partir de um mesmo promotor em todos os RNAm dos diferentes tipos virais, na região próxima ao gene E6 (Sousa, Dostatni e Yaniv, 1990; Cheah e Looi, 1998). A LCR também é composta por sítios de ligação de fatores transcricionais que são importantes para a regulação da RNA polimerase II (Zheng e Baker, 2006).

Há dois modos de replicação do HPV. O primeiro ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma viral é distribuído às células filhas. A integração do genoma viral garante uma infecção persistente nas células proliferativas das camadas basais, associadas ao maior risco de malignização celular. No segundo, chamado epissomal ou vegetativo, a replicação do HPV ocorre nas camadas mais diferenciadas do epitélio e não há a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (Zur Hausen, 2002). Apesar dos processos de replicação e expressão gênica serem regulados de acordo com a diferenciação da célula infectada, este mecanismo ainda não é totalmente conhecido.

A transcrição ocorre de maneira diferenciada em determinados tipos celulares, na dependência da interação viral com o genoma da célula hospedeira e do grau de diferenciação do epitélio (**Figura 4**). Dessa forma, os genes precoces (E) são expressos na camada basal do tecido infectado e continuam nas linhagens celulares subseqüentes, observados em células benignas e malignas, enquanto os genes tardios (L) são expressos somente em células ceratinizadas, resultando na produção de partículas virais completas e infectantes observadas nas verrugas e nos condilomas (Zur Hausen, 2002).

Figura 4 – Representação esquemática da diferenciação epitelial anormal induzida por infecção pelo HPV. São comparados epitélios normal e infectado pelo HPV e as funções virais dependentes da diferenciação celular estão listadas (Fehrmann e Laimins, 2003).

1.3.3 As proteínas da região E do genoma viral

As funções das proteínas do HPV estão resumidas na **Tabela 1**. As codificadas pela região E são capazes de interagir com várias proteínas da célula hospedeira, interferindo no controle do ciclo celular, resposta apoptótica, sinalização celular e expressão gênica, podendo colaborar com a transformação maligna da célula (Zur Hausen, 2000).

Tabela 1 - Característica das regiões regulatórias (ORFs) do HPV (Stanley, Pett e Coleman, 2007).

ORF	Função Principal
E6	Transformação celular, ligação e degradação de p53
E7	Transformação celular, ligação com a proteína do retinoblastoma (pRb) e ativação da transcrição celular
E8	Função pouco conhecida
E1	Replicação do DNA viral e manutenção do plasmídeo
E2	Regulação da transcrição viral
E3	Função desconhecida
E4	Ligação à citoceratina (destruição de ceratina e formação do halo de coilocitose)
E5	Transformação celular através da interação com receptores do fator de crescimento
L2	Proteína secundária do capsídeo
L1	Proteína principal do capsídeo

A proteína E1 possui uma fraca afinidade pela sequência comum [AACNAT], que se encontra repetida seis vezes na região LCR. Durante a infecção, E1 é expresso em baixos níveis e requer associação com E2 a fim de ser direcionado aos seus sítios de ligação de maneira eficiente. A proteína E2 se liga, primeiramente, à E1 pela sua extremidade N-terminal e em seguida, através da região C-terminal, adere-se ao DNA (Sarafí e McBride, 1995; Moscufo *et al.*, 1999). A formação do complexo E1-E2 na LCR causa uma distorção no DNA viral, o que facilita o recrutamento de mais moléculas de E1. A proteína E1 pode também se associar com proteínas celulares do tipo *heat-shock* (Hsp40 e Hsp70), contribuindo para a formação de complexos E1 (Lee *et al.*, 1999).

E2 é uma proteína de ligação ao DNA que reconhece uma sequência palindrômica [AACCGNNNNCGGTT] na região não codificante do genoma viral (Dell *et al.*, 2003). Além disso, participa do início da replicação do DNA e da segregação do genoma nas células basais, é necessária durante o recrutamento da helicase E1 para a região de origem (LCR) e se liga a proteínas importantes para a replicação do DNA como a RPA (*Replication protein A*) e a DNA polimerase α -primase (Loo e Melendy, 2004). O papel de E2 na ancoragem dos epissomos virais para os cromossomos mitóticos é essencial para a correta segregação do material genético do HPV e em alguns tipos de Papilomavírus, envolve a participação da proteína celular Brd4, que se liga à E2 através da sua região C-terminal (You *et al.*, 2004; Mcphillips, Ozato e McBride, 2005). Uma função adicional da E2 é a regulação do promotor precoce (p97 em HPV 16 e p99 em HPV 31) e o controle da expressão dos oncogenes E6 e E7. Em baixos níveis, E2 atua como ativador transcricional, enquanto que em altos níveis promove supressão da expressão das oncoproteínas pelo deslocamento do ativador SP1 no promotor precoce (Doorbar, 2006).

A ORF que codifica E4 é expressa mais tardiamente durante a infecção, facilitando e dando suporte à amplificação do genoma, regulando a expressão de genes tardios, participando da maturação e liberação de partículas virais (Zur Hausen, 2002; IARC, 2007). Apesar da E4 ser a proteína mais expressa durante o ciclo de vida do HPV, ela não participa da transformação celular e sua expressão decresce progressivamente durante a carcinogênese (Crum *et al.*, 1990; Doorbar *et al.*, 1991; Doorbar *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1997). Além disso, a E4 pode induzir apoptose por redução do potencial de membrana das mitocôndrias (Davy *et al.*, 2002; Heise, 2003) e contribuir diretamente para o rompimento dos filamentos de citoceratina celular, produzindo a imagem do halo de coilocitose (Zheng e Baker, 2006; Torrente e Ojeda, 2007).

Nem todos os HPVs possuem a ORF para proteína E5, que possui tamanhos variados entre os papilomavírus. Mesmo com diferenças na sequência de aminoácidos, a natureza hidrofóbica da E5 é conservada (Dimaio e Mattoon, 2001). E5 altera a expressão de genes envolvidos em sinalização mitogênica, motilidade e adesão celular (Genther Williams *et al.*, 2005). Através da ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R), a E5 interfere em várias vias de transdução de sinal como, por exemplo, na via da proteína MAP-quinase (Crusius, Auvinen e Alonso, 1997). Além disso, a E5 do HPV 16 inibe a apoptose induzida pela Fas, com o ligante indutor de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (TRAIL) (Kabsch e Alonso, 2002) ou por luz ultravioleta (UV) (Zhang, Spandau e Roman, 2002). Com respeito à adesão celular, E5 promove a degradação das junções celulares do tipo GAP (Oelze *et al.*, 1995).

A propriedade mais bem conhecida da oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco é a capacidade de degradar a proteína supressora de tumor p53 através do recrutamento da proteína ligase E6-AP (E6-associated protein), (Scheffner *et al.*, 1990; Huibregtse, Scheffner e Howley, 1993). O complexo E6/p53 remove o controle do ciclo celular dependente de p53, provocando o aumento de divisão celular, instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada (Zur Hausen, 1996; Scheurer, Tortolero-Luna e Adler-Storthz, 2005). Por outro lado, a ligação da E6 de HPVs de baixo risco à p53 não promove sua degradação e portanto não colabora para os eventos de carcinogênese (Li e Coffino, 1996). Adicionalmente, a E6 se liga a várias outras proteínas celulares, resultando em alterações das vias transcricionais, perda da adesão celular pela degradação das junções entre as células epiteliais (*tight junctions*) e modificação da arquitetura celular por remodelamento dos filamentos de actina (Watson *et al.*, 2003). Além disso a E6 inibe a apoptose e respostas ao dano no DNA, levando à instabilidade genômica e imortalização da células hospedeira (IARC, 2007). Esta última consequência da proteína E6 ocorre devido à indução da expressão e atividade da

telomerase (Gewin e Galloway, 2001; Oh, Kyo e Laimins, 2001), porém, os mecanismos, pelos quais a E6 leva a imortalização celular ainda não são bem conhecidos.

A E7 dos HPVs de alto risco oncogênico é uma proteína nuclear com aproximadamente 100 aminoácidos que forma um dímero na região C-terminal através de um motivo do tipo *zinc-finger* (Fehrman e Laimins, 2003). Sua principal atividade inclui a associação com membros da família de supressor tumoral do retinoblastoma (Rb) (Vousden, 1994). A ligação E7/Rb causa a degradação da Rb, impedindo que esta se ligue ao fator transcricional E2F (Weinberg, 1995). Desta forma, E7 burla a parada do ciclo celular, promovendo a progressão do ciclo. A proteína E7 do HPV de baixo risco tipo 1 também é capaz de se ligar à Rb, porém não consegue degradá-la (Giarre *et al.*, 2001). Outros estudos com HPVs de alto risco oncogênico demonstraram que a E7 bloqueia a atividade dos inibidores das cinases ciclino-dependentes (CKIs) p21 (Funk *et al.*, 1997; Jones, Alani e Munger, 1997) e p27 (Zerfass-Thome *et al.*, 1996). A inibição destas CKIs pela E7 altera a capacidade da p53 de ativar o ponto de checagem da fase G1 em caso de dano no DNA (Demers *et al.*, 1994; Hickman, Picksley e Vousden, 1994).

1.3.4 Classificação dos Papilomavírus

Tradicionalmente, os Papilomavírus são classificados em tipos, os quais foram detectados tanto em infecções em humanos quanto em pássaros e bovinos (IARC, 2007). Há mais de 15 anos que o ORF L1, por ser a região mais bem conservada do genoma viral, é utilizado para a identificação de novos tipos de Papilomavírus. Diferenças maiores do que 10% na sequência que codifica L1 determinam os tipos, diferenças entre 2% e 10% definem um subtipo e abaixo de 2% definem uma variante viral (De Villiers *et al.*, 2004).

Os tipos de HPV de pele ou mucosa podem ser classificados como de baixo ou de alto risco oncogênico, dependendo da interação do DNA viral com o genoma da célula hospedeira

(Bonfiglio, 1997). Na maioria dos casos, a infecção pelo HPV resulta em uma proliferação epitelial benigna (verruga) (Torrente e Ojeda, 2007), no entanto, tipos oncogênicos de HPV podem induzir a transformação maligna na presença de determinados cofatores ambientais como o tabaco, o álcool e outros (Madkan *et al.*, 2007).

De acordo com os dados de Martinez *et al.* (2007) já foram descritos mais de 150 diferentes tipos HPV. Na cavidade oral, 24 tipos (HPVs-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) foram associados com lesões benignas e 12 tipos (HPVs-2, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 57) com lesões malignas. A maioria dos HPVs de baixo risco (6, 11, 13 e 32) está associada a lesões papilomatosas benignas da mucosa oral e apresentam pequeno potencial de progressão maligna. Em contraste, os genótipos de alto risco (16, 18, 33 e 58) têm potencial de malignidade aumentado e estão freqüentemente associados às displasias epiteliais e carcinoma de células escamosas orais (Bouda *et al.*, 2000; Sand *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2002).

1.4. O Checkpoint de fuso mitótico

O ciclo celular é dividido em quatro fases (G1, S, G2 e M). Cada fase é controlada por complexos de proteínas que funcionam como reguladores positivos e negativos. Dentre estas proteínas, as ciclinas e várias cinases constituem os principais componentes na regulação do ciclo. Antes do início de cada fase há um “controle de qualidade”, chamado de pontode checagem ou *checkpoint*, que detecta disfunções e erros nestes processos, parando o ciclo até que o erro seja completamente reparado. Em condições normais, se não houver meios para solucionar os erros, a célula pára o ciclo e entra em estado de senescência ou em apoptose. Durante o ciclo podem ser identificados três principais *checkpoints*: entre a fase G1/S, o da fase G2 e o da fase mitótica (M) (Delaval e Birnbaum, 2007). Muitos componentes dos *checkpoints* G2 e M estão alterados em células cancerosas (Kastan e Bartek, 2004).

O *checkpoint* de fuso mitótico (*Mitotic Spindle Checkpoint* ou *Spindle Assembly Checkpoint* – SAC) é uma via complexa e conservada entre as espécies, que possui o objetivo de monitorar a transição entre as etapas de metáfase e anáfase durante a mitose. O modelo básico deste *checkpoint* define que defeitos na tensão dos microtúbulos ou cromossomos desligados do fuso levam a ativação do SAC, que pode agir de duas maneiras: promovendo o desligamento dos microtúbulos quando ambas as cromátides irmãs estão presas ao fuso erroneamente ou retardando o início da anáfase até que todos os erros sejam corrigidos e todos os cromossomos estejam conectados aos microtúbulos e alinhados no fuso mitótico corretamente (Ruchaud, Carmena e Earnshaw, 2007; Greene *et al.*, 2008). O cinetócoro é uma região do cromossomo onde se ligam os microtúbulos do fuso mitótico. Os eventos que ocorrem nesta região do cromossomo foram cuidadosamente investigados através de RNA de interferência (Chen, 2002; Johnson *et al.*, 2004).

Já está bem estabelecido que as cinases ciclino-dependentes (CDKs) conduzem as células de um estado quase quiescente após G2 para uma reorganização altamente dinâmica da cromatina e da arquitetura do citoesqueleto na fase M (Jackman e Pines, 1997). No entanto, as CDKs atuam isoladas e por isso são acionadas outras estruturas do programa mitótico que agem diretamente nos cromossomos, no fuso mitótico e no citoesqueleto. Por exemplo, a família das Auroras fosforilam as histonas promovendo a condensação cromossômica, além de interagir com outras proteínas. De maneira semelhante, as *polo-like kinases* (PLKs) são necessárias em vários pontos durante a mitose, incluindo na maturação dos centrossomos, ativação do complexo promotor de anáfase (*Anaphase-promoting complex/cyclosome* - APC/C) e na saída da mitose (Nigg, 1998).

Cromossomos sem ligação com o fuso emitem um sinal de parada que culmina com a inibição do Cdc20 (*cell-division-cycle 20 homologue*) que funciona como co-fator do APC/C, uma ubiquitina-ligase reguladora de vários processos do ciclo (Peters, 2002; Peters, 2006). A

formação do complexo ativo APC-Cdc20 promove a degradação da Pds1 (securina), ativando então a separase que degrada a coesina presente na ligação que mantém as cromátides irmãs unidas. Adicionalmente, este complexo degrada a ciclina B1, levando à inativação da CDK1 e conseqüente progressão da mitose (Peters, 2002).

Os primeiros componentes do *checkpoint* mitótico: Bub (*budding uninhibited by benzimidazole*) 1-3, Mad (*mitotic arrest deficient*) 1-3 e Mps1 (*monopolar spindle 1*) foram identificados através de mapeamento genético de leveduras em desenvolvimento (Hoyt, Totis e Roberts, 1991; Weiss e Winey, 1996). A partir de então foram descobertos seus homólogos em humanos e as funções de cada componente no controle do *checkpoint* foram elucidadas (**Tabela 2**).

Muitas das proteínas do *checkpoint* mitótico Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3 (BubR1), Mps1, Ip11 (Aurora B), Cenp-F e Cenp-E (*centromere protein E*) se localizam transitoriamente em seqüência nos cinetócoros que não estão conectados ao fuso, indicando ausência de tensão gerada pela ligação do cinetócoro ao microtúbulo (Chen, 2002; Johnson *et al.*, 2004). Essas proteínas formam complexos que se difundem com o objetivo de se ligar e inibir o Cdc20, evitando que este se ligue ao APC. Quando os cromossomos ficam alinhados corretamente, os níveis destas proteínas diminuem e o ciclo celular continua, passando para a fase de anáfase (**Figuras 5 e 6**). A localização das proteínas de *checkpoint* nos cinetócoros ocorre por meio de um evento ordenado e bastante organizado. A princípio, é necessário que haja Bub1 para que as demais proteínas se liguem ao cinetócoro. No entanto, a ausência de Bub1 (Johnson *et al.*, 2004) ou Cenp-F (Holt *et al.*, 2005) não compromete a função do SAC, sugerindo a existência de múltiplos pontos de início para o SAC. Estudos observaram que nem sempre a presença destas proteínas no cinetócoro é essencial para a ativação do *checkpoint* (Canman *et al.*, 2002; Ditchfield *et al.*, 2003).

Tabela 2 – Proteínas do *checkpoint* mitótico (Kops, Weaver e Cleveland, 2005).

Proteína	Características	Proteína de ligação	Função no <i>checkpoint</i>
Bub1	122 kDa; cinase serina-treonina	Bub3	Inibe Cdc20 por fosforilação
BubR1	120 kDa; cinase serina-treonina	Cenp-E, Bub3, Cdc20	Compõe o complexo inibidor de APC/C; liga-se diretamente a Cdc20 e inibe a atividade do APC/C
Bub3	37 kDa; estrutura determinada: 7 – <i>bladed propeller</i> de repetições WD40	Bub1, BubR1	Compõe o complexo inibidor de APC/C. Localiza Bub1 e BubR1 no cinetócoro
Mad1	83 kDa; <i>coiled coil</i>	Mad2	Recruta Mad2 para o cinetócoro
Mad2	23 kDa; estrutura determinada	Mad1, Cdc20, CMT2/p23 ^{comet}	Compõe o complexo inibidor de APC/C; liga-se diretamente a Cdc20 e inibe a atividade do APC/C
CMT2/p23^{comet}	31 kDa	Mad2	Função antagonista à Mad2; inibe a sinalização do <i>checkpoint</i>
Mps1	97 kDa; cinase duplamente específica	desconhecido	Desconhecido
Cenp-E	312 kDa; proteína motora do microtúbulo extremidade mais	BubR1	Ativa BubR1 em cinetócoros desconectados dos microtúbulos
ZW10	89 kDa	ROD, Zwilch	Parte do complexo que recruta o heterodímero Mad1-Mad2 para os cinetócoros desconectados dos microtúbulos
ROD	251 kDa	ZW10, Zwilch	Parte do complexo que recruta o heterodímero Mad1-Mad2 para os cinetócoros desconectados dos microtúbulos
Zwilch	67 kDa	ROD, ZW10	Parte do complexo que recruta o heterodímero Mad1-Mad2 para os cinetócoros desconectados dos microtúbulos

Figura 5 – Posicionamento dos cinetócoros durante as principais fases que participam do *checkpoint* mitótico. **A)** Representação da Prometáfase em linhagem HeLa, o DNA ao fundo (azul) e os pontos em vermelho são os cinetócoros marcados com anticorpo anti-centrossomo; **B)** Representação da Metáfase; **C)** Representação da Anáfase (Kops, Weaver e Cleveland, 2005).

Figura 6 – Mecanismo de funcionamento do *checkpoint* de fuso mitótico. **A)** Recrutamento de Mad1-2, Mps1, Bub1, Bub3, BubR1 e Cenp-E pelos cinetócoros desligados do fuso (regiões em cinza, diagrama expandido pelas linhas tracejadas). A atividade de BubR1, ativado pela ligação com Cenp-E, é essencial para a sinalização do *checkpoint*. As ações de todos os componentes são necessárias para que seja gerado e difundido um complexo de parada que sequestra ou inibe o Cdc20, que é o ativador do APC/C. A separase, protease que degrada as coesinas que unem as cromátides irmãs, está inibida através de ligação com a securina; **B)** Assim que cada par de cinetócoros irmãos se ligam aos microtúbulos (em verde), e as proteínas motoras do microtúbulo geram força tensora que os esticam, o sinal de parada do ciclo é cessado. Ao menos um componente que sinaliza a ligação é a Cenp-E, pois captura o microtúbulo para o cinetócoro e assim a atividade da cinase BubR1. **C)** Ao ser silenciado o sinal de parada emitido por cada cinetócoro, o APC/C promove a ubiquitinação (Ub) da securina e da ciclina B1, que são degradadas pelo proteossomo, resultando em entrada na fase de anáfase (Kops, Weaver e Cleveland, 2005).

1.4.1 A relação entre proteínas virais com o checkpoint mitótico

Já é conhecido que várias proteínas codificadas por vírus possuem a capacidade de induzir alterações nos controles do *checkpoint* mitótico e dessa forma, promover anormalidades mitóticas, aneuploidia e instabilidade genômica. Jin, Spencer e Jeang (1998) pesquisando alvos celulares para a oncoproteína Tax do HTLV-1 (*Human T lymphotropic virus type 1*), identificaram TXBP181, que foi caracterizada como homólogo humano da proteína Mad1 de leveduras. Com esses dados, foi então proposto um modelo de transformação viral onde a Tax se ligaria à TXBP181, anulando assim o *checkpoint* mitótico. Alguns anos depois, associou-se a alta instabilidade cromossômica da leucemia de células T em adultos com a perda da Pds1p/securina e da Clb2/ciclina B1 promovida pela oncoproteína Bax do HTLV-1 antes da célula entrar em mitose (Liu *et al.*, 2003). De maneira menos direta, foi sugerido que a oncoproteína EBNA3C, essencial para a imortalização de células B pelo Vírus Epstein Barr (EBV), tem a capacidade de desregular a via ciclina/CDK-pRb-E2F e como consequência, inibir o SAC (Parker, Touitou e Allday, 2000). Recentemente, um estudo mostrou que a localização nuclear da EBNA2 do EBV em linhagens de células neoplásicas diminui a expressão de Mad-2 em 2-3 vezes e aumenta a da Plk1 em torno de 2 vezes, comprometendo o SAC e levando à instabilidade cromossômica (Pan *et al.*, 2009).

O antígeno T pequeno do Vírus Símio 40 induz anormalidades centrossômicas a partir da interação com o regulador mitótico PP2A, que tem como um dos substratos a proteína Aurora A (Lavia *et al.*, 2003). Outro antígeno do mesmo vírus, o antígeno T grande, interage com a proteína do SAC Bub1, contribuindo para a transformação celular, instabilidade genômica e aneuploidia (Cotsiki *et al.*, 2004). Já a proteína X do Vírus da Hepatite B (HBx) se liga diretamente à BubR1, havendo uma co-localização nos cinetócoros. Esta ligação atenua a associação entre BubR1 e Cdc20, fazendo com que a célula burle o *checkpoint* mitótico na presença de drogas desestabilizadoras dos microtúbulos (Kim *et al.*, 2008).

1.5. A proteína *BubR1*

O nome das proteínas Bub advém do fato que leveduras mutantes nos respectivos genes dessas proteínas perdem a capacidade de parar o ciclo celular na fase mitótica quando expostas a drogas que desorganizam o fuso, por isso a denominação “*budding uninhibited by benzimidazoles*” (enxerto não inibido por benzimidazoles), (Baker *et al.*, 2004). Além de BubR1 (*Bub1-related protein*), outras denominações também são utilizadas: Mad3 e Bub1b. No entanto, Bub1b não é a proteína em si, mas o gene que codifica as proteínas BubR1 e Bub1.

A BubR1 humana é uma proteína multi-domínios com 1050 resíduos de aminoácidos (Taylor, Ha e Mckee, 1998). Seus domínios podem ser facilmente identificados através de alinhamento via BLAST com a sequência de BubR1 do *Xenopus*, que é homóloga à proteína humana (Mao, Abrieu e Cleveland, 2003). A BubR1 humana consiste de um motivo KEN Box (resíduos 26-28), uma região Mad3-like (resíduos 52-204), um domínio de ligação a Bub3 (resíduos 392-433) e um domínio cinase (749-1018) (Yoon *et al.*, 2005). A **Figura 7** mostra a disposição desses domínios em *Xenopus*.

Figura 7 - A disposição dos domínios protéicos de BubR1 em *Xenopus*. O domínio Caixa KEN, o domínio N-terminal semelhante à Mad3, a região de ligação à proteína Bub3 e o domínio cinase (Mao, Abrieu e Cleveland, 2003).

Através da região N-terminal é que BubR1 interage com Cdc20. Mesmo *in vitro*, BubR1 fosforila Cdc20, impedindo a ligação desta ao APC, inibindo a progressão da mitose (Fang, 2002). Recentemente, demonstrou-se que BubR1 compete com Cdc20 na ligação pela securina e a interação BubR1-securina contribui para a estabilidade da securina, que também seria favorecida pela degradação de Cdc20. Uma correlação positiva foi encontrada entre as expressões de BubR1 e securina em cânceres humanos (Kim *et al.*, 2009). Já o domínio cinase C-terminal é fundamental para ativação de BubR1 a partir da ligação com a Cenp-E no centrômero (Mao, Abrieu e Cleveland, 2003). Progressivas deleções na região C-terminal de BubR1 (48-477) reduz a função do *checkpoint* mitótico, aumentando em duas vezes a chance de originar células com conteúdo genético acima de 4N. Por outro lado, a inibição da atividade cinase de BubR1 por mutação no sítio catalítico não altera o *checkpoint* mitótico, sugerindo que a atividade cinase não é necessária para que BubR1 desempenhe sua função no SAC (Harris *et al.*, 2005).

1.5.1 BubR1 no câncer

Baker *et al.* (2004) investigaram os papéis fisiológicos de BubR1 em camundongos que expressavam diferentes níveis protéicos. Os animais *knockout*, ou seja, com o gene *Bub1b* desabilitado (-/-), foram incompatíveis com a vida, morrendo ainda durante o desenvolvimento embrionário. Com apenas 4% do nível protéico normal, os animais chegaram a nascer, porém viveram apenas algumas horas. Contudo, foi estabelecido que os níveis protéicos suficientes para o desenvolvimento dos órgãos e crescimento até a fase adulta se encontram entre 4% e 11% dos níveis normais. Apesar de vivos, os animais nesta faixa de expressão eram inférteis e apresentavam sinais bem estabelecidos de senescência precoce. Desta forma, pôde-se sugerir uma correlação direta entre a expressão protéica de BubR1 e a eficiência do SAC (Baker *et al.*, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que alterações na expressão de BubR1 possuem relação com perda do *checkpoint* mitótico, instabilidade cromossômica e/ou carcinogênese. Foi observada uma superregulação do gene *Bub1b* em linhagens celulares de câncer pulmonar (Seike *et al.*, 2002). Em linhagens celulares aneuploides de neoplasias malignas hepáticas e tireoideanas, foram encontrados alguns polimorfismos no gene *Bub1b*, porém sem correlação com instabilidade cromossômica ou alteração do *checkpoint* mitótico (Ouyang *et al.*, 2002; Saeki *et al.*, 2002). Grabsch *et al.* (2003) demonstraram que em carcinoma gástrico os elevados níveis transcricionais de BubR1 não estão relacionados com aneuploidia. Além disso, a superexpressão de BubR1 tem sido identificada por diversas metodologias, tais como PCR em tempo real, *Western blot* ou imunoistoquímica. Os resultados dos estudos mostram associação direta com alto grau histológico, recorrência e progressão tumoral, estágios avançados do câncer e menor sobrevida dos pacientes em diferentes tipos de câncer, como por exemplo, no carcinoma de bexiga (Yamamoto *et al.*, 2007), câncer renal (Pinto *et al.*, 2008) e carcinoma de ovário (Lee *et al.*, 2009).

Os níveis de BubR1 também podem predizer a eficácia ou falha de tratamentos quimioterápicos para cânceres humanos. Porém o valor preditivo varia de acordo o tipo da droga e o tecido envolvido. Enquanto no câncer de esôfago, a baixa expressão de BubR1 mostrou aumentar a sensibilidade à quimioterapia (Tanaka *et al.*, 2008), em linhagens celulares de carcinoma de ovário (Fu *et al.*, 2007), de mama (Sudo *et al.*, 2004) e no tratamento da Síndrome da separação prematura das cromátides, foi constatada resistência ao tratamento (Matsuura *et al.*, 2006). Contrariamente, foi sugerido que a superexpressão de BubR1 pode contribuir para a resistência no tratamento do câncer gástrico (Greene *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão imunoistoquímica da proteína BubR1 em lesões orais benignas e Carcinomas orais de células escamosas (OSCC) com e sem metástases associadas à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Verificar a presença de material genético do HPV nas lesões orais benignas e malignas, assim como nos respectivos linfonodos cervicais das lesões com metástase, através da reação em cadeia da polimerase (PCR);

2.2.2. Identificar nas lesões positivas para HPV os tipos virais de alto risco 16 e 18 através do método da PCR, utilizando iniciadores específicos;

2.2.3. Avaliar a expressão imunoistoquímica de BubR1 nos diferentes tipos de lesões orais e linfonodos;

2.2.4. Verificar se o padrão de expressão de BubR1 está relacionado com a presença do HPV e/ou com o nível de malignidade das lesões orais;

2.2.5. Verificar se a infecção por HPV e o padrão de expressão de BubR1 têm influência na sobrevida do paciente com OSCC.

3. Casuística e Métodos

3.1. Aspectos Éticos

O protocolo do presente estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Experimentação Humana do Hospital das Clínicas (HCFMRP-USP) e enquadrado como APROVADO, de acordo com o Processo nº 9802/07 (**Anexo A**).

3.2. Amostras

Foram selecionadas 86 biópsias de lesões orais do Arquivo de Serviço de Patologia (SERPAT) do HCFMRP-USP, retrospectivamente em um período de sete anos (2000-2007). Dentre as biópsias selecionadas, 16 eram lesões orais benignas (LO^B) diagnosticadas como fibroma traumático e sem antecedentes de neoplasia maligna, 20 tinham diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral *in situ* (OSCC^{IS}), 27 eram carcinomas invasores sem metástase (OSCC^S), 23 eram carcinomas invasores com metástase (OSCC^M) e 23 linfonodos cervicais (LN) dos respectivos carcinomas com metástase. Em seguida, as lâminas histológicas de cada biópsia selecionada coradas em hematoxilina-eosina foram reavaliadas por um patologista experiente. As biópsias foram submetidas a novos cortes histológicos de 5µm de espessura, os quais foram colocados em lâminas pré-tratadas com Poli L-lisina (**Anexo B**) e submetidos ao método de imunoistoquímica para avaliação da proteína BubR1. Dois cortes adicionais de 10µm de espessura foram retirados das biópsias com a finalidade de extrair DNA e para a detecção e identificação dos HPVs tipo 16 e 18.

Os prontuários médicos pertencentes aos pacientes de cada biópsia foram obtidos e analisados através do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP) a fim de coletar informações clínicas dos pacientes, tais como idade, sexo, história de tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, data do diagnóstico, data do último seguimento e quando o paciente veio a óbito, a data e causa do mesmo. Além

destes dados, foram identificados o local anatômico acometido pela lesão (língua, lábio, assoalho da boca, gengiva, mucosa oral e área retromolar), o estadiamento do tumor através do sistema TNM (Sobin e Wittekind, 2002), se o paciente foi submetido a algum tipo de tratamento (cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia) e se teve recorrência da doença.

Como critérios para inclusão e exclusão no estudo, as biópsias selecionadas deveriam pertencer à pacientes distintos e nos casos de lesões orais benignas, foram excluídos os pacientes com história prévia de tumor maligno na cavidade oral. Com relação ao consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, os pacientes foram classificados de maneira dicotômica como consumidores ou não. Foram considerados não-fumantes os indivíduos que nunca haviam fumado e consumidores de bebida alcoólica aqueles que faziam uso de álcool com alguma frequência, independente do número de doses e o tipo de bebida. Idade e gênero não foram considerados critérios para a seleção.

3.3. Reação de imunoistoquímica para BubR1

A reação de imunoistoquímica para BubR1 foi realizada utilizando o método complexo avidina-biotina (ABC), (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom). As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool (Synth-Diadema, SP) para a completa desparafinização e posterior hidratação. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão Tris-EDTA pH 9,0 e submetidos à fervura em *steamer* (panela à vapor) durante 35 minutos à 98 °C. As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e tratadas durante 20 minutos com peróxido de hidrogênio 30v diluído em PBS sem metanol para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após serem lavados novamente três vezes com PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos em soro normal de cavalo 1:50 diluído em PBS com a finalidade de reduzir as ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida,

incubados com o anticorpo primário anti-BubR1 em câmara úmida à temperatura ambiente *overnight* (Mouse monoclonal, 1:100, diluído em BSA; Abcam – ab54894, Cambridge, UK). Decorrido o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (diluição de 1:200 em BSA) e em seguida com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Novostain kit super ABC, 1:100 em PBS, NovoCastra, Wetzlar, Alemanha) em temperatura ambiente por 30 minutos cada. Entre as incubações do anticorpo secundário e ABC, os cortes foram lavados três vezes com PBS. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 5 minutos com uma solução contendo 5mg de diaminobenzidina (DAB, GIBBICO, Gaithersburg, Maryland, USA) dissolvida em 5ml de PBS mais 120µl de peróxido de hidrogênio. A reação do DAB foi bloqueada com uma lavagem em PBS seguida por lavagens com água destilada. As lâminas foram então contra coradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas com água corrente, desidratadas com três lavagens em álcool absoluto, imersas duas vezes em xilol e montadas com Permount (MERCK, Darmstadt, Germany). Todas as etapas após a recuperação antigênica foram realizadas em temperatura ambiente. Os protocolos das soluções utilizadas na reação de imunoistoquímica estão descritos no **Anexo B**.

Foi selecionada uma biópsia de amígdala normal para controle positivo da reação, pois é um tecido de fácil acesso e que contém células altamente proliferativas em seus centros germinativos (Borum-Auensen *et al.*, 2007a). Como controle negativo da reação, foi utilizado um corte da mesma amígdala do controle positivo, mas substituindo a incubação do anticorpo primário por uma incubação com PBS *overnight*.

3.4. Avaliação qualitativa de BubR1

A interpretação qualitativa dos resultados imunoistoquímicos da proteína BubR1 foi realizada por um único patologista experiente. Os padrões de expressão foram classificados como negativo, leve, moderado e intenso de acordo com a intensidade e distribuição da imunomarcacão no corte histológico. Foi considerada como baixa expressão as lesões classificadas como marcação negativa e leve. Quando as lesões apresentavam marcação moderada ou intensa, estas foram então consideradas como alta expressão de BubR1.

3.5. Aquisição das imagens e avaliação quantitativa de BubR1

Imagens das lesões marcadas através da reação de imunoistoquímica foram obtidas com um microscópio trinocular Olympus BX41[®] acoplado a uma câmera colorida CCD Samsung[®] (SDC-313/243) e o software PCTV Pinnacle Media Center[®]. As imagens foram analisadas com o software ImageJ 1.41o (Rashband). Para a quantificação da marcação celular da proteína BubR1, foram capturadas em média oito imagens randômicas da área de carcinoma em cada lâmina. Nas lesões orais benignas, foram capturadas imagens aleatórias da região epitelial. Os controles não foram considerados na análise quantitativa porque eles foram utilizados apenas para a padronização da reação imunoistoquímica.

Foi utilizado o método contador de células (*cell counter method*) de acordo com (Girish e Vijayalakshmi, 2004), através do qual as células marcadas podem ser contadas de forma direta a partir do monitor, posicionando marcas ou pontos de diferentes cores nas células positivas e negativas por meio de cliques com o mouse. Ao final, o ImageJ gera um índice imunoistoquímico e todos os dados da contagem são exportados para planilhas no software Microsoft Excel, onde é disponibilizada uma somatória dos resultados da contagem

de uma lâmina. Após a contagem, foram calculadas as médias de células marcadas para cada caso e os respectivos erros padrões, além de realizadas as análises estatísticas.

3.6. Detecção e Tipagem do HPV

3.6.1. Extração de DNA genômico de tecido parafinizado

Dois cortes histológicos de tecido parafinizado, com 10µm de espessura foram submetidos à extração de DNA de acordo com o protocolo proposto por Bettini *et al* (2003) e modificado neste estudo. Os cortes histológicos foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5ml, adicionados de 1000µL de xilol absoluto em cada tubo. O tecido parafinizado contendo xilol foi homogeneizado por inversão, incubado em banho-maria a 65°C por 10 minutos e submetido à centrifugação a 12000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido cerca de 4 a 5 vezes até a retirada completa da parafina. Na última centrifugação, o sobrenadante foi removido e foram adicionados quantidades decrescentes de xilol:etanol nas proporções de 750:250µl, 500:500µl e 250:750µl. Em cada etapa, a amostra foi homogeneizada, centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e ao final, o sobrenadante foi descartado. Na última etapa, foram realizadas duas lavagens do sedimento acrescentando 1000µl de etanol absoluto seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. No sedimento final foi adicionado 1ml de tampão de lise I, os microtubos foram então homogeneizados, centrifugados a 12000 rpm, por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento obtido foi ressuspensão agora com 300µl de tampão de lise II acrescido de 5µl de proteinase K (10mg/ml) e os microtubos incubados em banho-maria a 65°C *overnight*. Após o período de incubação, os microtubos foram submetidos à temperatura de 94°C por 10 minutos para inativar a proteinase K. O DNA extraído foi acondicionado a -20°C até o momento dos experimentos de amplificação para a

detecção do HPV. Todas as soluções e o protocolo da extração de DNA estão descritos no **Anexo C**.

3.6.2. Amplificação do gene da Beta-globina e da região consenso do HPV

A amplificação da região consenso do HPV foi realizada pela técnica da PCR, utilizando os iniciadores GP5+ (5' - TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC TAC - 3') e GP6+ (3' - CTT AT ACT AAA TGT CAA ATA AAA AG - 5'), que amplificam um fragmento de DNA de aproximadamente 150pb da região L1, comum a todos os tipos de HPV (De Roda Husman *et al.*, 1995). Como controle interno da reação e para avaliar a integridade do DNA genômico pós-extração, a amplificação da região consenso do HPV foi realizada juntamente com iniciadores para o gene da beta-globina humana (PCO3+ 5'-CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3') e (PCO4+ 3'-CCA CTT GCA CCT ACT TCA ACA CCA CT-5'), que amplificam um fragmento de 110pb (Saiki *et al.*, 1985).

A mistura para a reação de PCR, chamada de Mix, foi constituída de: 1µl de DNA genômico, 0,25µl da solução com os quatro deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) numa concentração de 20mM cada, (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1,5µl de cada iniciador GP5+/GP6+ na concentração de 10 pmol/µl, (IDT, IA, USA), 0,25µl de cada iniciador PCO3+/PCO4+ na concentração de 10 pmol/µl, 0,25µl de Taq DNA polymerase 5U/µl (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1,5µl de MgCl₂ 50 mM, 3,5µl de *buffer* 10x (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 14µl de água destilada e deionizada para completar um volume total de 23 µl.

Os ciclos da reação foram estabelecidos segundo Iwasawa *et al.* (1997) e modificados posteriormente nas etapas de padronização. Assim, as condições de ciclagem durante a reação de PCR seguiram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos, seguida de 37 ciclos subsequentes de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 45°C por 45

segundos e extensão a 72°C por um minuto, e por último, mais um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.3. Amplificação com iniciadores tipo específico HPV 16 e HPV 18

Durante as reações de PCR para identificação dos tipos de HPV 16 e 18 foram utilizados os iniciadores HPV16E7.667 (5' - GTA GAA ATA GTA GGT CCA GC - 3') e HPV16E7.774 (5' - GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C - 3') para o tipo viral 16 e os iniciadores HPV18E7.799 (5' - GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA - 3') e HPV18E7.696 (5' - AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG GA - 3') para o HPV 18 de acordo com (Walboomers *et al.*, 1999). Os produtos das PCRs constituíram fragmentos de aproximadamente 100pb da região E7 do genoma do HPV.

O mix para PCR para ambos os tipos virais foi constituído por: 2µl de DNA genômico, 0,25µl da solução com os quatro deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) numa concentração de 20mM cada, (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1,25µl de cada iniciador HPV16 E7.667/E7.774 ou HPV18 E7.799/E7.696 na concentração de 10 pmol/µl, (IDT, IA, USA), 0,25µl de Taq DNA polymerase 5U/µl (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,75µl de MgCl₂ 50 mM, 2,5µl de *buffer* 10x (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 18,25µl de água destilada e deionizada para completar um volume total de 24,5 µl.

Os ciclos da reação foram estabelecidos segundo Iwasawa *et al.* (1997) e modificados posteriormente nas etapas de padronização. Assim, as condições de ciclagem durante a reação de PCR seguiram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos subsequentes de desnaturação a 94 °C por um minuto, hibridização a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, e por último, mais um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. As condições de ciclagem durante a PCR foram idênticas para os dois tipos de HPVs pesquisados.

3.6.4. Controles

Os controles positivos, também chamados de amostra padrão, para amplificação da região consenso do HPV, beta-globina e HPVs 16 e 18 foram amostras sabidamente infectadas pelos tipos virais aqui analisados. Como controle negativo, todos os reagentes da PCR foram adicionados em um microtubo 0,2ml, porém sem adicionar amostra de DNA.

3.6.5. Separação eletroforética e análise do produto amplificado

Para visualizar os fragmentos amplificados de DNA, os produtos da PCR foram aplicados em géis de poliacrilamida não desnaturante 10%, submetidos à eletroforese vertical e corados conforme o método descrito por Sanguinetti, Dias Neto e Simpson (1994). Em todas as corridas eletroforéticas foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb.

Para a polimerização do gel de poliacrilamida, foram misturados 20ml do mix para gel com 20µl de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 350µl de solução saturada de persulfato de potássio. Imediatamente, distribuiu-se esta mistura em um cassete, previamente, montado com duas placas de vidro intercaladas por espaçadores de teflon. Em seguida, foi introduzido um pente de teflon na borda superior para a formação dos sulcos onde eram aplicadas as amostras e aguardado o tempo de polimerização de aproximadamente 30 minutos. O gel então foi montado em uma cuba eletroforética vertical contendo tampão TBE diluído 10 vezes em água destilada, em ambos os pólos. Em um microtubo, 5µl do produto da PCR mais 5µl de corante tamponado foram misturados e aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 250volts durante duas horas.

Após a eletroforese, foi realizada a revelação do gel de acordo com as seguintes etapas: fixação do gel com 100ml de solução fixadora por 1 minuto em agitação; impregnação com 1ml de nitrato de prata 20% adicionados aos 100ml de solução fixadora

sob agitação durante 5 minutos; lavagem do gel em água corrente; revelação com 100ml de solução reveladora previamente aquecida por um minuto no microondas acrescida de 1ml de formaldeído sob agitação até o completo aparecimento das bandas e bloqueio da revelação com solução fixadora. Após o processo de revelação, foi realizada a leitura do gel através da identificação do tamanho das bandas amplificadas em cada amostra. Para arquivamento dos resultados das PCRs, todos os géis passaram por secagem, onde os mesmos foram colocados entre duas folhas de papel celofane embebidas em água e postas sobre uma placa de vidro durante aproximadamente 12 horas. As soluções e reagentes utilizados para eletroforese estão descritos no **Anexo D**.

3.7. Análises estatísticas

A distribuição dos três parâmetros clínicos (idade, exposição ao fumo e ao álcool) foi comparada entre os diferentes grupos (LO^B , $OSCC^{IS}$, $OSCC^S$ e $OSCC^M$) pelo teste exato de Fisher com o uso do software GraphPad InStat (San Diego, CA, USA), o qual também foi utilizado para a estimativa do *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (95% IC). As idades, descritas em médias aritméticas e erros padrões, também foram comparada entre os grupos pelo teste T de Student.

As diferenças da expressão qualitativa de BubR1 entre os grupos com e sem carcinoma, de acordo com os dados clínico - patológicos, foram avaliadas através do teste Exato de Fisher . Em casos de tabelas mais complexas, foi realizado um Teste exato que utiliza *Metropolis algorithm* para obter o valor de p e o erro padrão, software RxC ([HTTP://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.html](http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.html)). Já para análise da expressão quantitativa de BubR1, os dados da contagem de células marcadas passaram no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) e por isso foram realizados os testes paramétricos One-way

ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer e Unpaired t teste com correção de Welch. A análise de correlação entre OSCC^M e LN foi calculada pelo teste de correlação de Spearman.

As diferenças de prevalência de HPV e seus tipos nos grupos estudados foram avaliadas através do teste exato realizado pelo software RxC. A correlação entre a expressão de BubR1 e a prevalência de HPV foi analisada pelo teste exato de Fisher . Já a comparação entre a média de células marcadas nos carcinomas HPV positivos com alta e baixa expressão de BubR1 foi analisada pelo Unpaired t teste com correção de Welch. E quando os dados não passaram no teste de normalidade KS, foi realizado o teste de Mann-Whitney.

As análises de sobrevida foram realizadas através da curva de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram analisadas pelo teste de Log Rank (GraphPad Prism version 4.00 for Windows, San Diego, CA, USA). A sobrevida acumulada foi calculada a partir da data de diagnóstico ou cirurgia até a data do último seguimento ou óbito do paciente. Foi considerado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$), portanto, valores de $p \leq 0.05$.

4. Resultados

4.1. Lesões orais e parâmetros clínicos

Um total de 86 biópsias de lesões orais foi estudado a partir de 71 pacientes do sexo masculino e 15 do sexo feminino com em média $56,79 \pm 13,01$ anos de idade. A média de idade e a proporção de homens e mulheres foram homogêneas entre os quatro grupos de lesões estudados. No entanto, ao avaliar a idade de acordo com o sexo dos pacientes, notamos que as mulheres foram diagnosticadas com carcinoma oral em torno dos 70 anos de idade, enquanto os homens em torno dos 55 anos (**Figura 8**). Observamos ainda que 80,2% dos pacientes eram tabagistas e 66,3% consumiam bebidas alcoólicas e que o grupo LO^B teve um perfil diferente de consumo quando comparado aos grupos de carcinoma oral. Enquanto a maioria, entre 70-100% dos pacientes com lesões malignas, independente do grupo pertencente, fumava e consumia bebidas alcoólicas, apenas uma pequena porcentagem do grupo sem câncer oral, entre 18,8-37,5%, tinha este hábito (**Tabela 3 e Figura 9**). Informações a respeito do consumo de tabaco e álcool não foram encontradas nos prontuários médicos de, respectivamente, quatro e cinco pacientes do grupo LO^B.

Tabela 3 – Parâmetros clínicos dos 86 pacientes avaliados de acordo com sexo, idade e exposição ao tabaco e álcool.

Variável	LO ^B n = 16	OSCC ^{IS} n = 20	OSCC ^S n = 27	OSCC ^M n = 23	TOTAL N = 86
Idade (M $\pm$ DP)	52.94 $\pm$ 14.55	54.45 $\pm$ 11.51	59.41 $\pm$ 12.76	58.43 $\pm$ 13.25	56.79 $\pm$ 13.01
Sexo n(%)					
Masculino	10 (62.5%)	18 (90.0%)	21 (77.8%)	22 (95.6%)	71 (82.6%)
Feminino	6 (37.5%)	2 (10.0%)	6 (22.2%)	1 (4.4%)	15 (17.4%)
Tabaco n(%)					
Sim	6 (37.5%)	20 (100%)	21 (77.8%)	22 (95.6%)	69 (80.2%)*
Não	6 (37.5%)	0 (0%)	6 (22.2%)	1 (4.4%)	13 (15.1%)*
Álcool n(%)					
Sim	3 (18.8%)	14 (70.0%)	19 (70.4%)	21 (91.3%)	57 (66.3%)*
Não	8 (50.0%)	6 (30.0%)	8 (29.6%)	2 (8.7%)	24 (27.9%)*

LO^B = Lesão oral benigna; OSCC^{IS} = Carcinoma de células escamosas oral *in situ*; OSCC^S = Carcinoma de células escamosas oral invasor sem metástase; OSCC^M = Carcinoma de células escamosas oral invasor com metástase.

(*) Informações sobre tabaco e álcool disponíveis nos prontuários. M = Média; DP = Desvio padrão.

Figura 8 – Representação da idade média de todos os pacientes com carcinoma oral, organizados de acordo com o tipo de lesão e sexo.

Figura 9 – Representação da porcentagem de pacientes tabagistas e consumistas de bebidas alcoólicas de acordo com o tipo de lesão.

As análises estatísticas dos parâmetros clínicos dos pacientes demonstraram que, no geral, mais homens foram diagnosticados com câncer oral, especialmente invasor com metástase, quando comparados aos pacientes do grupo sem câncer. A frequência do consumo de tabaco e álcool foi significativamente maior em pacientes com carcinoma do que nos pertencentes ao grupo LO^B. Avaliando os grupos com câncer de forma separada, os grupos de carcinoma *in situ* e invasor com metástase apresentaram maior número de pacientes tabagistas e consumistas de álcool do que o grupo de lesões orais benignas. O hábito de fumar foi mais freqüente entre pacientes com carcinoma invasor sem metástase apenas quando comparamos este grupo com o grupo de carcinoma *in situ* ($p = 0.0312$). Por outro lado, com relação ao hábito de consumir bebidas alcoólicas, o grupo de pacientes com carcinoma invasor sem metástase apresentou mais pacientes consumistas de álcool do que o grupo sem câncer oral (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros clínicos de todos os pacientes com câncer versus pacientes sem câncer oral e entre os diferentes grupos de carcinoma de células escamosas oral.

Variável	Idade ^a	Sexo ^b	Tobaco ^b	Álcool ^b
OSCC ^{IS} vs. LO ^B	$p = 0.7368$	$p = 0.1034$ OR = 5.400 CI (0.9128-31.947)	$p = 0.0010$ OR = 41.000 CI (2.022-831.32)	$p = 0.0309$ OR = 6.222 CI (1.212-31.950)
OSCC ^S vs. LO ^B	$p = 0.1517$	$p = 0.3126$ OR = 2.100 CI (0.5392-8.179)	$p = 0.1331$ OR = 3.500 CI (0.8204-14.932)	$p = 0.0309$ OR = 6.222 CI (1.212-31.950)
OSCC ^M vs. LO ^B	$p = 0.2382$	$p = 0.0127$ OR = 13.200 CI (1.397-124.69)	$p = 0.0033$ OR = 22.000 CI (2.201-219.87)	$p = 0.0003$ OR = 28.000 CI (3.919-200.03)
Câncer oral vs. LO ^B	$p = 0.2432$	$p = 0.0296$ OR = 4.067 CI (1.188 to 13.925)	$p = 0.0027$ OR = 9.000 CI (2.275-35.603)	$p = 0.0020$ OR = 9.000 CI (2.133 to 37.977)
OSCC ^S vs. OSCC ^{IS}	$p = 0.1706$	$p = 0.4369$ OR = 0.3889 CI (0.06963-2.172)	$p = 0.0312$ OR = 0.08068 CI (0.0043-1.526)	$p = 1.0000$ OR = 1.018 CI (0.2876-3.603)
OSCC ^M vs. OSCC ^S	$p = 0.7936$	$p = 0.1068$ OR = 6.286 CI (0.6962-56.750)	$p = 0.1068$ OR = 6.286 CI (0.6962-56.750)	$p = 0.0850$ OR = 4.421 CI (0.8326-23.475)

LO^B = Lesão oral benigna; OSCC^{IS} = Carcinoma de células escamosas oral *in situ*; OSCC^S = Carcinoma de células escamosas oral invasor sem metástase; OSCC^M = Carcinoma de células escamosas oral invasor com metástase.

$p = p$ -valor; OR = Odds Ratio; CI = 95% Intervalo de confiança; ^aUnpaired t teste; ^bTeste exato de Fisher.

4.2. Expressão qualitativa de BubR1 e parâmetros clínico-patológicos

A imunomarcagem da proteína BubR1 foi classificada em baixa e alta expressão de acordo a distribuição e intensidade da marcação celular observada por um patologista experiente. Todas as biópsias do grupo de lesões orais benignas apresentaram baixa expressão, enquanto nas biópsias com carcinoma foi observada alta expressão em 15 das 20 amostras do grupo *in situ* (75%), em 19 das 27 amostras do grupo invasor sem metástase (70%) e em 18 das 23 amostras do grupo invasor com metástase (78%). Foi observada também uma alta expressão na imunomarcagem de BubR1 em 15 das 23 biópsias (65%) de linfonodos cervicais metastáticos correspondentes às lesões invasoras com metástase. A **Figura 10** mostra a marcação imunoistoquímica de BubR1 em algumas lesões orais estudadas.

Apesar da maioria das biópsias de carcinoma oral ter apresentado uma alta expressão de BubR1, quando avaliamos as amostras com câncer oral divididas em grupos não encontramos qualquer associação entre o padrão da expressão qualitativa de BubR1 e os parâmetros clínico-patológicos, tais como local do tumor, estadiamento TNM, tratamento, recorrência da doença e óbito do paciente. No entanto, foi encontrada associação entre a expressão qualitativa de BubR1 e o local do tumor quando todas as biópsias com carcinoma foram avaliadas juntas ($p = 0.0078 \pm 0.0003$). Foram observados padrões opostos da expressão de BubR1 na língua e gengiva. Enquanto 28 das 33 biópsias de carcinoma oral localizado na língua apresentaram alta expressão proteica de BubR1, a maioria dos carcinomas na gengiva mostrou baixa expressão de BubR1, como descreve a **Tabela 5**. Ainda na mesma tabela podemos observar que nos lábios, assoalho da boca e mucosa oral houve predominância de alta expressão. Já a região retromolar não apresentou diferença com relação ao nível de expressão.

Figura 10 - Expressão de BubR1 determinada pela reação de imunoistoquímica. (A) Expressão de BubR1 em células dos centros germinativos (setas) de uma amígdala normal utilizada como controle positivo; (B) Ausência de expressão em amígdala normal sem a etapa de incubação com o anticorpo primário (controle negativo); (C) Lesão oral benigna negativa para BubR1, mas com coilócitos – células infectadas por HPV – expressando a proteína (seta); (D) Alta expressão de BubR1 em carcinoma oral *in situ*; (E) Alta expressão de BubR1 em carcinoma invasor com metástase; (F) Linfonodo cervical apresentando alta expressão da proteína em um foco de células malignas (seta) e marcação difusa nos linfócitos ao redor da neoplasia.

Tabela 5 – Correlação entre a expressão qualitativa de BubR1 e os parâmetros clínico-patológicos nas amostras de carcinoma oral avaliadas.

	Biópsias com câncer oral (n = 70)		<i>p</i> valor $\pm$ <i>E.P.</i>
	Baixa Expressão	Alta Expressão	
Local			
Língua	5	28	^a <i>p</i> = 0.0078 $\pm$ 0.0003
Lábio	3	9	
Assoalho da boca	2	6	
Gengiva	5	1	
Mucosa oral	0	5	
Região retromolar	3	3	
TNM			
Tis	2	7	^a p = 0.7944 $\pm$ 0.0008
T1-T2	12	29	
T3-T4	4	16	
Nx	7	15	^a p = 0.7793 $\pm$ 0.0009
N0	4	14	
N1-N3	7	23	
Mx	17	50	^b p = 1.000
M0	1	2	
Tratamento			
Cirurgia	6	15	^a p = 0.9704 $\pm$ 0.0002
Cirurgia + RTx e/ou QTx	8	25	
RTx e/ou QTx	3	10	
Outros tratamentos*	1	2	
Recorrência			
Sim	8	22	^b p = 1.000
Não	10	30	
Óbito			
Sim	3	22	^b p = 0.0850
Não	15	30	
Total (n)	18	52	

T = relacionado ao tamanho do tumor; Tis = Carcinoma *in situ*; N = relacionado à metástase linfonodal; M = relacionado a metástases distantes; RTx = radioterapia; QTx = quimioterapia; (*) Outros tratamentos: fototerapia ou tratamento em outro serviço; EP = Erro padrão.

^a RxC software (<http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>)

^b Teste exato de Fisher

4.3. Expressão quantitativa de BubR1 nas lesões orais

Semelhante aos resultados da avaliação qualitativa, as análises quantitativas de BubR1 mostraram um número significativamente maior de células expressando a proteína nas lesões orais malignas, o que não foi observado nas lesões orais benignas. A média de células marcadas e seus respectivos desvios padrões em cada grupo analisado foram: LO^B (21.5 ± 5.172), OSCC^{IS} (68.6 ± 2.108), OSCC^S (70.1 ± 1.635) e OSCC^M (65.8 ± 2.429). Os linfonodos cervicais avaliados apresentaram uma média de células marcadas (65.1 ± 1.873) com BubR1 muito semelhante à média encontrada nas respectivas lesões orais primárias do grupo OSCC^M, como pode ser observado na **Figura 11**.

Figura 11 - Média percentual de células marcadas com BubR1 de acordo com o tipo de lesão oral avaliada.

Já nas análises de múltiplas comparações das médias de células marcadas com BubR1, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de lesões benignas e os grupos com carcinoma oral. Porém, não obtivemos resultados significantes quando os diferentes grupos de carcinoma oral foram comparados entre si, como descreve a **Tabela 6**. Apesar da análise de variância da expressão quantitativa entre o grupo OSCC^M e seus respectivos LN não ter apresentado resultado significativo através do teste de Wilcoxon ($p = 0.1895$), houve uma significativa correlação entre os mesmos, com $p < 0.0001$ ($r = 1.000$).

Tabela 6 – Comparação da expressão quantitativa de BubR1 em carcinomas orais *versus* lesões orais benignas.

Grupos	<i>p</i> valor
OSCC ^{IS} vs. LO ^B	^a $p < 0.001$ *
OSCC ^S vs. LO ^B	^a $p < 0.001$ *
OSCC ^M vs. LO ^B	^a $p < 0.001$ *
OSCC ^S vs. OSCC ^{IS}	^a $p > 0.05$
OSCC ^S vs. OSCC ^{IS}	^a $p > 0.05$
OSCC ^M vs. OSCC ^S	^a $p > 0.05$
Câncer oral vs. LO^B	^b $p < 0.001$ *

LO^B = Lesão oral benigna; OSCC^{IS} = Carcinoma de células escamosas oral *in situ*; OSCC^S = Carcinoma de células escamosas oral invasor sem metástase; OSCC^M = Carcinoma de células escamosas oral invasor com metástase.

(*) Resultados significantes estatisticamente.

^aOne-way ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer ($p < 0.0001$).

^bUnpaired t teste com correção de Welch ($p < 0.0001$).

4.4. Detecção do HPV e sua correlação com a expressão de BubR1

Nenhum dos 86 pacientes incluídos no estudo possuía registro ou diagnóstico prévio de infecção por HPV na cavidade oral e, no entanto, setenta e nove biópsias (91.9%) foram positivas para HPV e 22 dos 23 linfonodos cervicais (95.6%) também apresentaram DNA viral. Com relação ao tipo viral, o HPV 16 foi detectado em 11 (13.9%) lesões orais e em 4 (17.4%) linfonodos, enquanto o tipo viral 18 foi detectado em 17 (21.5%) lesões e 4 (17.4%) linfonodos cervicais (**Figura 12**). Infecções com ambos os tipos virais foram encontradas em

dois casos de carcinoma invasor sem metástase, em cinco carcinomas invasores com metástase e em dois linfonodos (8.7%), como mostra a **Tabela 7**. Ao analisar a prevalência dos tipos de HPVs em cada grupo de lesão oral estudado, observamos que o HPV 16 estava presente em todos os tipos de lesão, porém o com maior prevalência no grupo de câncer invasor com metástase. A presença de HPV 18 foi, significativamente, maior nos grupos com carcinoma oral invasor com e sem metástase do que nos grupos de carcinoma *in situ* e no grupo de lesões orais benignas ($p = 0.000146$).

Tabela 7 – Prevalência de HPV nas lesões orais benignas e malignas.

Vírus	<u>LO^B</u> n = 16	<u>OSCC^{IS}</u> n = 20	<u>OSCC^S</u> n = 27	<u>OSCC^M</u> n = 23	<i>p-valor</i>
HPV +	16 (100%)	15 (75%)	25 (92.6%)	23 (100%)	$p = 0.010949$
HPV 16	2 (12.5%)	1 (6.7%)	2 (8%)	6 (26.1%)	$p = 0.311207$
HPV 18	0	0	6 (24%)	11 (47.8%)	$p = 0.000146$
HPV 16 and 18	0	0	2 (8%)	5 (21.7%)	$p = 0.062210$

LO^B = Lesão oral benigna; OSCC^{IS} = Carcinoma de células escamosas oral *in situ*; OSCC^S = Carcinoma de células escamosas oral invasor sem metástase; OSCC^M = Carcinoma de células escamosas oral invasor com metástase.
RXC software (<http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>)

Ao relacionar o HPV com os outros dois principais fatores etiológicos do OSCC (tabaco e álcool), foi observado que o número de pacientes com carcinoma infectados pelo HPV (90%) foi maior do que o de pacientes que relataram consumo de álcool (77%), porém igual ao número de pacientes fumantes (90%). Por outro lado, ao compararmos a prevalência de HPV entre os pacientes tabagistas ou alcoolistas, encontramos mais amostras positivas para HPV em pacientes que não fumantes e não consumistas de álcool. Em todos os pacientes não tabagistas foi detectado HPV, ao mesmo tempo em que uma menor porcentagem dos pacientes tabagistas (89.8%) apresentaram infecção viral. Já em 91.7% dos pacientes que não consumiam bebidas alcoólicas, contra 89.6% dos que consumiam, foram HPV positivos.

Figura 12 – Eletroforese da reação em cadeia da polimerase (PCR) em gel de poliacrilamida 10%. **A)** Amplificação do gene β -globina (110pb), todas as amostras positivas e GP5/GP6 + (150pb). Foi detectado DNA do HPV nas amostras das canaletas 2-7, 11 e 12. Nas canaletas 1 e 8-9 não houve amplificação da região pesquisada; **B)** Amplificação da região E7 do HPV 18 (100pb), amostras positivas nas canaletas 5, 6 e 11; **C)** Amplificação da região E7 do HPV 16 (100pb), amostras positivas nas canaletas 4 e 10.

Houve maior prevalência de HPV (76.2%) nos casos de carcinoma que apresentaram alta expressão de BubR1. Já o número de amostras negativas para HPV foi semelhante nos casos com alta ou baixa expressão de BubR1, ou seja, a ausência do DNA do HPV não teve associação com um padrão de expressão da proteína BubR1, diferente dos casos HPV positivos. Um fato interessante observado na análise microscópica foi marcação específica de BubR1 no citoplasma de algumas células infectadas por HPV (coilocitos) em biópsia de lesão oral benigna, uma espécie de co-localização do vírus com a proteína que pode ser visualizada na **Figura 10 C**. Foi detectado mais HPV 18 em carcinomas orais que tiveram alta expressão de BubR1. No entanto, a presença do HPV 16 e ambos os tipos virais apresentaram uma prevalência muito similar de acordo com a imunomarcagem de BubR1 (**Figura 13**). As análises estatísticas não atribuíram uma associação significativa entre a presença do HPV e expressão qualitativa de BubR1, como descreve a **Tabela 8**.

Representação da expressão de BubR1 de acordo com a presença de HPV nos carcinomas orais de células escamosas.

Tabela 8 – Prevalência do HPV nos carcinomas orais de acordo com a expressão de BubR1.

Expressão de BubR1	HPV + n = 63	HPV - n = 7	HPV 16 n = 9	HPV 18 n = 17	HPV 16/18 n = 7
Alta	48 (76.2%)	4 (57.1%)	5 (55.6%)	13 (76.5%)	4 (57.1%)
Baixa	15 (23.8%)	3 (42.9%)	4 (44.4%)	4 (23.5%)	3 (42.9%)
valor de p	p = 0.3626		p = 0.1983	p = 1.0000	p = 0.3423

Teste exato de Fisher

Foi detectado o DNA do vírus HPV em 14 dos 15 linfonodos com alta expressão de BubR1. Destes, dois eram tipo 16 e três do tipo 18. Os nove linfonodos restantes positivos para HPV não pertenciam ao tipo 16 nem ao tipo 18 e, portanto foram considerados como sendo de outros tipos. Todas as lesões orais benignas foram HPV positivas e tiveram baixa expressão de BubR1, por isso não foram consideradas durante as análises estatísticas.

Considerando apenas as lesões orais positivas para HPV, a comparação entre as médias de células marcadas com BubR1, nos casos com alta expressão *versus* os casos com baixa expressão de BubR1, mostrou que o número de células marcadas foi significativamente diferente nos carcinomas com metástase, nos linfonodos cervicais e quando todos os carcinomas foram analisados juntos. Nos carcinomas invasores sem metástase, a diferença entre as médias de células marcadas foi quase significativa, tal qual mostra a **Tabela 9**.

Tabela 9 – Comparação das médias de células marcadas nos casos positivos para HPV com alta e baixa expressão de BubR1.

Casos HPV +	Alta expressão Média ± DP	Baixa expressão Média ± DP	<i>p</i> -valor
OSCC ^{IS} (n = 15)	70.3 ± 2.874	62.9 ± 2.276	^a p = 0.2945
OSCC ^S (n = 25)	72.1 ± 1.876	64.2 ± 3.166	^b p = 0.0558
OSCC ^M (n = 23)	68.9 ± 2.392	54.3 ± 4.463	^b p = 0.0278*
Carcinomas (n = 63)	70.5 ± 1.333	60.6 ± 2.343	^b p = 0.0014*
LN (n = 23)	69.6 ± 1.565	56.5 ± 2.570	^b p = 0.0010*

OSCC^{IS} = Carcinoma de células escamosas oral *in situ*; OSCC^S = Carcinoma de células escamosas oral invasor sem metástase; OSCC^M = Carcinoma de células escamosas oral invasor com metástase; LN = linfonodos cervicais. DP = Desvio padrão; (*) Resultados significantes estatisticamente.

^aTeste de Mann-Whitney; ^bUnpaired t teste com correção de Welch.

4.5. Análises de sobrevida

Após um acompanhamento médio de 25 meses, foram constatados 25 óbitos entre os 70 pacientes com diagnóstico de câncer oral. A média estimada de sobrevida acumulada desde a data do diagnóstico foi de 24 meses para os pacientes que apresentaram alta expressão de BubR1 e de 28 meses para aqueles com baixa expressão de BubR1 nas lesões orais. Dentre os 70 pacientes com carcinoma oral, 30 tiveram recorrência do câncer em um período médio de 13.5 meses após o diagnóstico inicial. Todas as biópsias dos pacientes sem câncer oral tiveram baixa expressão de BubR1 e nenhum destes 16 pacientes veio a óbito ou apresentou lesão maligna durante um acompanhamento médio de 24 meses. Por outro lado, os pacientes com OSCC que apresentaram alta expressão de BubR1 em suas biópsias tiveram uma sobrevida acumulada, significativamente, menor do que aqueles com baixa expressão de BubR1 (Teste de log rank, $p = 0.0479$), como mostrado na **Figura 14**. Não foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevida acumulada dos pacientes com linfonodos cervicais apresentando alta ou baixa expressão de BubR1 ($p = 0.5784$) (**Figura 15**).

Figura 14 - Sobrevida acumulada dos 70 pacientes com carcinoma oral de acordo com o padrão de expressão qualitativa de BubR1. A diferença entre as curvas foi significativa ($p = 0.0479$).

Figura 15 - Sobrevida acumulada dos 23 pacientes com linfonodos cervicais metastáticos de acordo com o padrão de expressão qualitativa de BubR1 ($p = 0.5784$).

A comparação das curvas de sobrevida acumulada dos pacientes com amostras HPV positivas e pacientes com amostras HPV negativas não apresentou diferença significativa ($p = 0.5315$). Apesar da diferença não ter sido significativa, os pacientes HPV positivo tiveram menor sobrevida do que os pacientes HPV negativo, como podem ser observados na **Figura 16**.

Figura 16 - Sobrevida acumulada dos 70 pacientes com carcinoma oral de acordo com a presença de HPV nas lesões ($p = 0.5315$).

Com relação ao tipo de HPV, não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevida ($p = 0.8074$), porém foi observado que os pacientes com HPV 18 apresentaram menor sobrevida do que os pacientes HPV 16 e do que os pacientes com infecção por outros tipos de HPV que não foram identificados neste estudo (**Figura 17**). Da mesma forma, a sobrevida dos pacientes com presença de HPV 18 os linfonodos cervicais foi menor do que a dos pacientes com HPV 16, no entanto, os pacientes com infecção linfonodal por outros tipos de HPVs, que não o 18 e 16, tiveram a menor curva de sobrevida acumulada observada ($p = 0.2593$), **Figura 18**.

Figura 17 - Sobrevida acumulada dos pacientes de acordo com o tipo de HPV nas lesões ($p = 0.8074$).

Figura 18 - Sobrevida acumulada dos pacientes com linfonodos positivos para HPV, de acordo com os tipos virais detectados nos linfonodos ($p = 0.2593$).

Dentre os 70 pacientes com carcinoma oral, 42 tiveram recorrência da neoplasia ou vieram a óbito, em média 12.48 meses após o diagnóstico. A partir destes pacientes foi construída a curva de sobrevida livre da doença de acordo com o padrão de expressão de BubR1 nas lesões orais destes pacientes. Foi observado, então, que os pacientes com alta expressão tiveram menor sobrevida livre da doença do que aqueles com baixa expressão. A diferença estatística entre as curvas de sobrevida livre da doença se mostrou quase significativa (Teste de log rank, $p = 0.0631$), **Figura 19**.

Figura 19 - Curvas de sobrevida livre da doença de acordo com o padrão de expressão de BubR1 ($p = 0.0631$).

5. Discussão

Ao analisar os resultados deste estudo, alguns fatores devem ser considerados. As amostras pertencem a uma população específica que foi acompanhada pelo serviço de cabeça e pescoço do HCFMRP-USP, um centro de referência que atende, em sua maioria, pacientes provenientes de outras cidades que não a de Ribeirão Preto. Por ser de caráter retrospectivo, o presente estudo está susceptível a algumas limitações de registro, disponibilidade e conteúdo das informações dos pacientes nos arquivos médicos. Apesar disso, os resultados dos dados clínicos coletados são semelhantes aos de estudos prévios realizados em outros países em desenvolvimento.

Acompanhando a tendência de outros estudos, a média de idade dos pacientes selecionados para o estudo, incluindo o grupo de lesões orais benignas, foi de 56.79 anos (Carvalho *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006; Ghoshal *et al.*, 2006). Geralmente, a proporção (homens:mulheres) acometidos pelo câncer oral varia entre 1.3:1 e 2:1 (Worrall, 2001; Garzino-Demo *et al.*, 2006; Arduino *et al.*, 2008). Porém quando se trata de populações provenientes de nações em desenvolvimento como a Índia e a República da Coreia, esta proporção aumenta para (3:1) (Choi *et al.*, 2006; Ghoshal *et al.*, 2006). Carvalho *et al.* (2004) compararam algumas características do câncer de cavidade oral em pacientes brasileiros e pacientes americanos e observaram que existem diferenças inerentes ao nível de desenvolvimento do país. Enquanto nos Estados Unidos a proporção de homens:mulheres acometidos pela doença foi de 1.2:1, muito mais homens do que mulheres foram diagnosticados no Brasil (3.7:1). Nós observamos que para cada paciente com diagnóstico de câncer oral do sexo feminino, 4.7 do sexo masculino foram incluídos em nosso estudo. Trata-se de uma proporção um pouco maior do que a descrita na literatura, mas condizente com a realidade observada em estudos anteriores no Brasil, Índia e Coreia. Sendo assim, considerando que as biópsias foram selecionadas sem ter o gênero do paciente como fator de

inclusão ou exclusão, a grande maioria de homens selecionada pode ser interpretada como uma característica epidemiológica do carcinoma de cavidade oral na região de Ribeirão Preto.

Pessoas que possuem o hábito de fumar e de consumir bebidas alcoólicas são mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer oral do que indivíduos que não estão sob influência destes fatores de risco (Massano *et al.*, 2006; Scully e Bagan, 2007). Além disso, fumantes pesados possuem sete vezes mais chances de desenvolver lesões orais do que não-fumantes (Nagler e Dayan, 2006; Napier e Speight, 2008; Scully e Bagan, 2009). Em nosso estudo, a exposição ao tabaco foi observada em 63 dos 70 (90%) pacientes com carcinoma oral, com uma variação de 77.8% - 100% entre os grupos estudados, confirmando o perfil esperado para pacientes com câncer de cabeça e pescoço, mesmo em países desenvolvidos (Wunsch-Filho, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; Ghoshal *et al.*, 2006; Simonato *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2009). No entanto, existem trabalhos que descrevem prevalências menores de consumo de tabaco entre pacientes acometidos por câncer oral, que varia de 50% a 65.5% (Choi *et al.*, 2006; Arduino *et al.*, 2008; Nemes *et al.*, 2008). A seleção das amostras aqui estudadas não teve como fator de inclusão e/ou exclusão o hábito de fumar, sendo então os resultados de exposição ao tabaco um perfil fidedigno da população avaliada neste estudo.

A exposição ao álcool sem dúvida é outro fator muito importante na carcinogênese bucal, mas ainda não está muito clara qual intensidade de consumo determina seu risco oncogênico. Lee *et al.* (2007) observaram que o álcool, independente da quantidade ingerida, interage sinergicamente com o tabaco durante diferentes processos no desenvolvimento do OSCC. A maioria dos nossos pacientes com carcinoma oral (70% - 91.3%) também consumia bebidas alcoólicas, o que mostra consistência com resultados de estudos anteriores na Hungria (75.5%) (Nemes *et al.*, 2008), no Brasil (80.9%) e nos Estados Unidos (69.8%)

(Carvalho *et al.*, 2004). Semelhante ao estudo de Rodriguez *et al.* (2004), que encontrou no grupo controle uma porcentagem parecida de pacientes que nunca fumaram, nós tivemos em nosso grupo de lesões orais sem câncer, o mesmo número de pacientes fumantes e não-fumantes. Por outro lado, quando observada a porcentagem de pacientes consumistas de álcool, nossos resultados não concordam com os de Rodriguez *et al.* (2004), pois cerca de 20% dos nossos pacientes sem câncer faziam uso de bebidas alcoólicas, contra 82% do grupo controle de Rodriguez *et al.* (2004).

Além dos fatores bem estabelecidos na carcinogênese bucal, que são o tabaco e o álcool, alguns vírus têm sido descritos como fatores etiológicos do câncer oral, de laringe e de faringe (Sand *et al.*, 2000; Wunsch-Filho, 2002). Dentre eles, o HPV está associado com maior risco de desenvolvimento de carcinoma oral, independente de exposição ao tabaco ou álcool (Nair e Pillai, 2005), com ênfase nos tipos virais chamados de alto risco oncogênico, especialmente os HPVs 16 e 18 que são os mais prevalentes (Massano *et al.*, 2006; Andrews, Seaman e Webster-Cyriaque, 2009). Divergindo de trabalhos realizados em outros países (Ostwald *et al.*, 2003a; Ritchie *et al.*, 2003; Anaya-Saavedra *et al.*, 2008), inclusive no Brasil (Oliveira *et al.*, 2009), que citam entre 20% e 43% de amostras de carcinoma oral HPV positivas, nós encontramos HPV em 90% dos carcinomas orais e em todas as lesões benignas. Semelhante aos nossos resultados, Bouda *et al.* (2000) e Furrer *et al.* (2006), utilizaram casuísticas menores do que a nossa e detectaram HPV em 95% e 100% dos OSCC respectivamente. Quando se trata de lesões hiperplásicas, espera-se que mais de 80% delas sejam HPV positivas, enquanto na mucosa oral normal, a prevalência de HPV varia de 0% - 55% (Bouda *et al.*, 2000; Giovannelli *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Llamas-Martinez *et al.*, 2008). Discordando da literatura citada, todas as lesões orais benignas incluídas neste estudo possuíam material genético do HPV, apesar de diagnosticadas como fibroma traumático. Tachezy *et al.* (2005) ao avaliar a presença de HPV em tumores da cavidade oral e

orofaringe, encontraram uma maior prevalência de HPV em pacientes que nunca fumaram (100%) e em pacientes que nunca consumiram álcool (68.8%). De maneira geral, nós observamos que a porcentagem de pacientes com OSCC HPV positivos (90%) superou a de pacientes consumistas de bebidas alcoólicas (77%), porém foi idêntica a de pacientes tabagistas (90%), o que nos permite sugerir que os efeitos do tabaco sobre a mucosa oral pode contribuir para uma maior susceptibilidade à infecção pelo HPV. No entanto, semelhante ao estudo previamente citado, a prevalência de HPV foi maior nas amostras de pacientes que não relataram consumo de tabaco ou álcool.

Independente das características histopatológicas e moleculares, a presença do HPV em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem sido relacionada com melhor prognóstico, melhor resposta terapêutica e melhores taxas de sobrevida livre da doença, quando comparada com amostras HPV negativas (Hoffmann *et al.*, 2005a; Hennessey, Westra e Califano, 2009). Um estudo com 32 amostras de cânceres de cabeça e pescoço observou maior sobrevida acumulada em pacientes infectados com HPV ou EBV do que naqueles sem infecção (Armas *et al.*, 2008). Uma maior sobrevida de pacientes com carcinoma de amígdala também foi relacionada com a presença do HPV de maneira diretamente proporcional à carga viral encontrada na lesão tumoral (Chien *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2008). Klotz *et al.* (2008) caracterizaram a presença do HPV como sendo um fator prognóstico de melhor sobrevida geral e específica da doença em pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe. No nosso trabalho, a presença de DNA do HPV nos carcinomas orais analisados não apresentou relação significativa com a curva de sobrevida dos pacientes. No entanto, as biópsias HPV positivas formaram o grupo de pacientes com menor sobrevida acumulada do que o grupo das lesões HPV negativas. Semelhante aos nossos resultados, Simonato *et al.* (2008) não encontraram diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevida dos pacientes brasileiros HPV positivos e HPV

negativos com carcinoma de assoalho bucal. Porém foi observado que a infecção pelo HPV influenciou de forma negativa, diminuindo a sobrevida desses pacientes. Provavelmente, o motivo da discordância observada quanto à sobrevida dos pacientes no Brasil com os de outros países, incluindo a população em estudo, está nas possíveis diferenças regionais inerentes ao comportamento e agressividade do HPV.

Os tipos de HPVs de alto risco 16 e 18 estão fortemente relacionados com a carcinogênese cervical, anogenital e oral (Ostwald *et al.*, 2003a; Rivero e Nunes, 2006). Embora a maioria dos autores cite o tipo 16 como o mais freqüente nas neoplasias orais malignas (Cruz *et al.*, 1996; Nagpal, Patnaik e Das, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Anaya-Saavedra *et al.*, 2008; Llamas-Martinez *et al.*, 2008), em nossas amostras de carcinoma ocorreu o inverso, pois 13% das biópsias apresentaram HPV 16 contra 24% das lesões positivas para HPV 18. Da mesma forma, Oliveira *et al.* (2009) e Soares *et al.* (2008) verificaram maior prevalência de HPV 18 do que HPV 16 em carcinomas de células escamosas orais diagnosticados no nordeste do Brasil. Já na Itália, Giovannelli *et al.* (2002) através de seqüenciamento do material genético viral, encontrou HPV 18 em mais de 80% das lesões malignas, benignas e casos controles analisados que eram HPV positivas. A maior freqüência de HPV 18 em mucosa oral e também em câncer cervical na Região de Ribeirão Preto-SP sugere que o Brasil possui características distintas quanto à prevalência de HPVs de alto risco oncogênico descrita mundialmente (Levi *et al.*, 2002; Preti, 2009). Concordando com os resultados de Luo, Roan & Liu (2007), nós detectamos um número significativamente maior de HPVs tipos 16 e 18 nas amostras de carcinoma do que nas lesões orais benignas. Com relação à co-infecção por ambos os tipos virais estudados, apenas os grupos OSCC com e sem metástase, correspondendo a 10% dos carcinomas avaliados, apresentaram este padrão de infecção viral, o que tornam os resultados consistentes com os de estudos anteriores (Nagpal, Patnaik e Das, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009).

Os genótipos do HPV, principalmente os considerados de alto risco oncogênico, também influenciam no padrão de evolução de alguns tipos de câncer e, apesar da alta prevalência encontrada em carcinoma de células escamosas anal, o papel do vírus na iniciação da proliferação da célula hospedeira não está relacionado com o resultado clínico ou sobrevida do paciente (Laytragoon-Lewin *et al.*, 2007). No entanto, em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, tanto a soro positividade quanto a presença de DNA do HPV 16 tem indicado uma melhor sobrevida geral do paciente e maior sobrevida livre da doença (Baez *et al.*, 2004; Furniss *et al.*, 2007; Begum e Westra, 2008). No carcinoma de orofaringe, a superexpressão de p16, marcador de atividade transcricional do HPV, quando associada à presença do HPV 16, acarreta em melhor sobrevida ao paciente (Weinberger *et al.*, 2006; Nichols *et al.*, 2009). A presença de HPV 16 nas biópsias de carcinoma oral apresentou uma relação com a melhor sobrevida dos pacientes apenas quando comparada com a curva dos pacientes HPV 18, discordando do padrão observado em orofaringe e em cabeça e pescoço. Por outro lado, os demais HPVs que não foram tipados indicaram maior sobrevida do que os HPVs 16 e 18. Sugiyama *et al.* (2007) sugeriram que a presença do HPV 16 e a situação dos linfonodos cervicais podem inferir significado prognóstico aos pacientes acometidos por carcinoma de células escamosas oral, pois a presença do HPV 16 em pacientes sem metástase linfonodal indicou maior sobrevida do que em pacientes HPV 16 negativo com metástase. Se a relação do HPV 16 com a sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço for confirmada e aceita pela comunidade científica, a quantificação viral em lavado salivar pode ser uma metodologia bastante promissora para detecção precoce de recorrências tumorais (Chuang *et al.*, 2008).

A expressão imunoistoquímica da oncoproteína E6 dos HPVs 16 e 18 em câncer pulmonar mostrou ser um bom marcador prognóstico, uma vez que um pequeno número de pacientes que expressaram ambas oncoproteínas tiveram uma taxa de sobrevida maior do que

os indivíduos que não as expressaram (Hsu *et al.*, 2009). Apesar dos estudos, a positividade do HPV tipo 18 ainda não tem uma significância tão conclusiva tal como se observa para o HPV 16 em carcinoma de cabeça e pescoço. Mesmo no câncer cervical, os resultados são contraditórios. Tong *et al.* (2007) concluíram que apesar do HPV 18 ter indicado menor sobrevida em pacientes com carcinoma cervical, nem a presença do HPV nem seu tipo viral possui significância prognóstica neste tipo de câncer. No mesmo ano, outro grupo de pesquisadores indicou através de análise multivariada que o HPV 18, juntamente com a análise de outras variáveis, está significantemente relacionado com recidiva de câncer cervical e, quando associado à idade acima dos 45 anos, também pode ser utilizado como preditor de óbito (Lai *et al.*, 2007). Em nossos casos de carcinoma oral, a presença do tipo viral 18 indicou o menor tempo de sobrevida quando comparado com o HPV 16 e os demais HPVs não tipados no estudo, sugerindo que da mesma forma que observado em carcinoma cervical, o HPV 18 possui uma tendência a ser relacionado com piores prognósticos no câncer em geral.

Em alguns trabalhos da literatura, vem sendo pesquisada a presença do HPV em linfonodos regionais de pacientes com câncer cervical, carcinoma peniano e de cabeça e pescoço (Picconi *et al.*, 2000; Peedicayil *et al.*, 2009). Em câncer cervical, mesmo quando o linfonodo não está acometido pela neoplasia, a presença do HPV é descrita como um fator prognóstico ruim porque é considerada como um sinal precoce de metástase, podendo ajudar na identificação de pacientes com risco de recorrência tumoral (Coutant *et al.*, 2007; Lee YS *et al.*, 2007; Slama *et al.*, 2008). Lukaszuk *et al.* (2007) sugeriram o rastreamento de HPV em linfonodos de pacientes com carcinoma cervical como uma estratégia no acompanhamento e planejamento terapêutico. Entretanto, em cânceres de cabeça e pescoço, ainda não está esclarecido o significado prognóstico da presença do HPV em linfonodos cervicais (Strome *et al.*, 2002; Sugiyama *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2005b). Um estudo

detectou HPV 16 em punções aspirativas de linfonodos metastáticos de carcinoma de cabeça e pescoço, porém a presença do vírus não influenciou no prognóstico dos pacientes (Begum *et al.*, 2007). Nós observamos que 95.6% dos linfonodos metastáticos eram HPV positivos, com iguais porcentagens (17.4%) dos tipos 16 e 18 e, apenas 8.7% mostraram co-infecção por ambos os tipos. Por termos selecionados linfonodos metastáticos a partir de um grupo de pacientes homogêneo com relação ao tipo de lesão, não pudemos observar se a presença do HPV nos linfonodos seria indicativa de micro-metástases, como foi descrito por outros autores (Strome *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2006). Apesar de não ter havido associação entre os linfonodos infectados por HPV 16 e/ou 18 com recidiva tumoral e óbito, os pacientes com HPV 16 nos linfonodos apresentaram a maior curva de sobrevida quando comparados aos pacientes com linfonodos HPV 18 e/ou demais tipos. A relação entre tipos específicos de HPV em linfonodos com o prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer também não está bem estabelecida. No entanto, a positividade do HPV 16 em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço já é reconhecida como indicador de melhor sobrevida (Begum e Westra, 2008).

Em estágios avançados do carcinoma de células escamosas oral, o conteúdo anormal de DNA celular tem se mostrado um marcador útil para diagnóstico diferencial e/ou preditor de metástases linfonodais ocultas (Massano *et al.*, 2006). A proteína BubR1 controla a ativação de outras proteínas pertencentes ao *checkpoint* do fuso mitótico (Choi e Lee, 2008), assegurando a integridade do material genético durante a segregação cromossômica (Musacchio e Hardwick, 2002; Taylor, Scott e Holland, 2004). Embora mutações no gene da proteína BubR1 e alterações na sua expressão tenham sido objetos de estudos em vários tipos de tumores (Ouyang *et al.*, 2002; Saeki *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2006; De Reynies *et al.*, 2009), a expressão imunoistoquímica desta proteína em cânceres de cabeça e pescoço tem sido pouco explorada. Em nosso estudo, setenta por cento dos carcinomas orais tiveram uma

expressão significativamente maior de BubR1 do que as lesões orais benignas. No entanto, não foi observada associação significativa do padrão de expressão com os parâmetros histopatológicos, exceto com o local acometido pelo carcinoma. Foi verificado que em linhagens celulares de câncer de pulmão, o gene que codifica BubR1 se encontra super regulado (Seike *et al.*, 2002). Mais recentemente, foram avaliados os níveis de mRNA de BubR1 em câncer renal e tecido renal normal e foi observado que a superexpressão no câncer estava relacionada com alterações genômicas e estadiamento tumoral (Pinto *et al.*, 2008). Grabsch *et al.* (2003) encontraram superexpressão de BubR1 em 68% das 43 amostras de carcinoma gástrico, porém sem associação com aneuploidia ou parâmetros histopatológicos. Em amostras de pacientes com colite ulcerativa que progrediram para displasia e câncer o aumento progressivo da expressão de BubR1 também não está associado com aneuploidia (Borum-Auensen *et al.*, 2007b).

Resultados semelhantes aos nossos, os quais demonstraram superexpressão de BubR1 associada com menor sobrevida geral e menor sobrevida livre da doença, foram descritos em carcinomas uroteliais de bexiga (Yamamoto *et al.*, 2007) e mais recentemente, em pacientes com câncer de ovário (Lee *et al.*, 2009). Em um estudo que relacionou o padrão de expressão de 43 genes com curvas de sobrevida, a combinação dos marcadores para BubR1 e PINK1 mostrou ser relevante na predição da sobrevida geral de pacientes com tumores adrenocorticais (De Reynies *et al.*, 2009). Já nos linfonodos dos carcinomas orais analisados neste trabalho, a expressão de BubR1 não indicou qualquer relação com a sobrevida dos pacientes. Apesar de não termos encontrado trabalhos avaliando o padrão de expressão desta proteína em linfonodos, Shichiri *et al.* (2002) demonstraram que a redução dos níveis de mRNA de BubR1 em carcinoma de colon está associada com metástases linfonodais e menor sobrevida livre da doença. De modo geral, os resultados observados nos carcinomas orais,

suportados por achados de estudos anteriores, indicam a proteína BubR1 como um marcador em potencial para prognóstico e sobrevida em alguns tipos de cânceres.

Várias das proteínas codificadas pelo genoma de vírus possuem a capacidade de interferir nos controles do *checkpoint* mitótico, induzindo anormalidades mitóticas, aneuploidias e instabilidade genômica (Parker, Touitou e Allday, 2000; Lavia *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). De acordo com o nosso conhecimento, não há trabalhos avaliando a expressão de BubR1 em tecido com história de infecção pelo HPV. Nós observamos que a presença do HPV foi mais freqüente (76%) nas amostras de carcinoma oral que apresentaram alta expressão de BubR1. Já as biópsias negativas para o DNA do HPV não mostraram um padrão homogêneo de marcação para BubR1, apresentando tanto alta como baixa expressão. Foi demonstrado que a co-localização da proteína X (HBx) do vírus da Hepatite B com a proteína BubR1 nos cinetócoros dos cromossomos diminui a associação entre BubR1 e Cdc20, burlando a parada mitótica induzida por drogas desestabilizadoras dos microtúbulos (Kim *et al.*, 2008).

Apesar de não podermos confirmar a interação direta de BubR1 com o vírus HPV devido a metodologia aplicada neste estudo, foi observada marcação específica de BubR1 em coilócitos em uma das biópsias sem carcinoma oral avaliadas. Esta observação sugere uma co-localização do HPV com BubR1 em algum momento da infecção viral. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para que se possa confirmar este indício. Ha *et al.* (2007) observou que a proteína BubR1 está envolvida na sinalização da apoptose, através de interação e ativação da p53. Sabendo que a oncoproteína E6 do HPV promove a degradação da p53 (Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Mammas *et al.*, 2008), supostamente, a superexpressão de BubR1 nos carcinomas orais pode ter ocorrido pela modificação das interações e da correta atividade de BubR1 com p53 pela oncoproteína E6 do HPV ou outra proteína viral. Outra possibilidade é o desenvolvimento de algum tipo de resposta

compensatória, consequência da provável competição de oncoproteínas do HPV com algum sítio de ligação de uma ou mais proteínas do *checkpoint* mitótico (Mad2, Cdc20 ou BubR1) ou mesmo inativação dessas proteínas através de ligação direta. Estas suposições, no entanto, precisam ser testadas e melhor estudadas em pesquisas futuras para que possamos entender o provável papel do HPV no *checkpoint* de fuso mitótico e na biologia do câncer oral.

6. Conclusões

De acordo com os resultados encontrados, foi possível concluir que:

- 1 – A prevalência de HPV nas amostras avaliadas foi um pouco maior do que a esperada, mas principalmente nas amostras sem câncer, onde encontramos 100% de positividade para o DNA viral;
- 2 – A maior prevalência do HPV 18, de fato, é uma característica observada nos pacientes da região analisada;
- 3 – A superexpressão de BubR1 foi predominante nos carcinomas orais infectados pelo HPV. Porém, o mecanismo dessa provável relação entre ambos não pôde ser confirmada;
- 4 – A superexpressão de BubR1 pode ser considerada um possível fator indicativo de menor sobrevida do paciente com carcinoma oral;
- 5 – Apesar da proporção (homem:mulher) acometidos pelo câncer oral ter sido mais elevada do que a descrita na literatura, as características clínicas e patológicas dos pacientes da região de Ribeirão Preto condiz com o padrão observado mundialmente.

Referências Bibliográficas

Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, *et al.* High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res*, 2008; 39 (2):189-97.

Andrews E, Seaman WT e Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol*, 2009; 45 (6):486-91.

Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Brocchetto R, Tirone F, Borra E, *et al.* Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008; 66 (8):1570-9.

Armas GL, Su CY, Huang CC, Fang FM, Chen CM e Chien CY. The impact of virus in N3 node dissection for head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008; 265 (11):1379-84.

Baez A, Almodovar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S, *et al.* High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck*, 2004; 26 (9):778-84.

Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, *et al.* BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet*, 2004; 36 (7):744-9.

Begum S, Gillison ML, Nicol TL e Westra WH. Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2007; 13 (4):1186-91.

Begum S e Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol*, 2008; 32 (7):1044-50.

Bettini JSR, Soares EG, Duarte G, Simões RT e Simões AL. PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytol*, 2003; 47 (4): 545-9.

Boing AF, Peres MA e Antunes JL. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979-2002. *Rev Panam Salud Publica*, 2006; 20 (1):1-8.

Bonfiglio TA. Diagnostic cytology of the uterine cervix: a major contribution and classic reference in gynecologic cytopathology. *Cancer*, 1997; 81 (6):324-7.

Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, *et al.* "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*, 2000; 13 (6):644-53.

Burum-Auensen E, De Angelis PM, Schjolberg AR, Kravik KL, Aure M e Clausen OP. Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BubR1 assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 2007a; 55 (5):477-86.

Burum-Auensen E, Deangelis PM, Schjolberg AR, Roislien J, Andersen SN e Clausen OP. Spindle proteins Aurora A and BUB1B, but not Mad2, are aberrantly expressed in dysplastic mucosa of patients with longstanding ulcerative colitis. *J Clin Pathol*, 2007b; 60 (12):1403-8.

- Canman JC, Sharma N, Straight A, Shannon KB, Fang G e Salmon ED. Anaphase onset does not require the microtubule-dependent depletion of kinetochore and centromere-binding proteins. *J Cell Sci*, 2002; 115 (Pt 19):3787-95.
- Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP e Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*, 2004; 26 (1):31-8.
- Cheah PL e Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol*, 1998; 20 (1):1-10.
- Chen RH. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol*, 2002; 158 (3):487-96.
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR e Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998; 7 (6):465-8.
- Chien CY, Su CY, Fang FM, Huang HY, Chuang HC, Chen CM, *et al.* Lower prevalence but favorable survival for human papillomavirus-related squamous cell carcinoma of tonsil in Taiwan. *Oral Oncol*, 2008; 44 (2):174-9.
- Choi E e Lee H. Chromosome damage in mitosis induces BubR1 activation and prometaphase arrest. *FEBS Lett*, 2008; 582 (12):1700-6.
- Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR, *et al.* Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol*, 2006; 42 (2):208-17.
- Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, *et al.* Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2008; 44 (10):915-9.
- Cohen MA, Basha SR, Reichenbach DK, Robertson E e Sewell DA. Increased viral load correlates with improved survival in HPV-16-associated tonsil carcinoma patients. *Acta Otolaryngol*, 2008; 128 (5):583-9.
- Conway MJ e Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*, 2009; 88 (4):307-17.
- Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, Perera D, *et al.* Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101 (4):947-52.
- Coutant C, Barranger E, Cortez A, Dabit D, Uzan S, Bernaudin JF, *et al.* Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer. *Ann Oncol*, 2007; 18 (9):1513-7.
- Crum CP, Barber S, Symbula M, Snyder K, Saleh AM e Roche JK. Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology*, 1990; 178 (1):238-46.

Crusius K, Auvinen E e Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*, 1997; 15 (12):1437-44.

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

Curado MP e Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*, 2009; 21 (3):194-200.

Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, *et al.* Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 2002; 76 (19):9806-18.

de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, *et al.* Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*, 2009; 27 (7):1108-15.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ e Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, 1995; 76 (Pt 4) 1057-62.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU e zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004; 324 (1):17-27.

Delaval B e Birnbaum D. A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis (Review). *Int J Oncol*, 2007; 30 (5):1051-8.

Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R e Gaston K. Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol*, 2003; 334 (5):979-91.

Demers GW, Foster SA, Halbert CL e Galloway DA. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994; 91 (10):4382-6.

DiMaio D e Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 2001; 20 (54):7866-73.

Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, *et al.* Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, 2003; 161 (2):267-80.

Dong YJ, Peng TK e Yin SJ. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. *Alcohol*, 1996; 13 (3):257-62.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 2005; 32 Suppl 1 S7-15.

_____. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 2006; 110 (5):525-41.

- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C e Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 1991; 352 (6338):824-7.
- Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, *et al.* Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 1997; 238 (1):40-52.
- Fang G. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*, 2002; 13 (3):755-66.
- Fehrmann F e Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 2003; 22 (33):5201-7.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P e Parkin DM. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide: IARCPress, Lyon 2004.
- Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR e Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem*, 2003; 51 (10):1291-7.
- Fu Y, Ye D, Chen H, Lu W, Ye F e Xie X. Weakened spindle checkpoint with reduced BubR1 expression in paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell line SKOV3-TR30. *Gynecol Oncol*, 2007; 105 (1):66-73.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B e Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 1997; 11 (16):2090-100.
- Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, *et al.* Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2007; 120 (11):2386-92.
- Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE e Modesti NM. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*, 2006; 35 (6):338-44.
- Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmasso P, Fasolis M, La Terra Maggiore GM, Ramieri G, *et al.* Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*, 2006; 34 (6):344-50.
- Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW e Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res*, 2005; 65 (15):6534-42.
- Gewin L e Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol*, 2001; 75 (15):7198-201.
- Ghoshal S, Mallick I, Panda N e Sharma SC. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. *Oral Oncol*, 2006; 42 (5):533-9.

Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ e Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol*, 2001; 75 (10):4705-12.

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

Girish V e Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer [serial online]* 2004; 41 (1):47.

Goldenberg D, Brooksby C e Hollenbeak CS. Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral Oncol*, 2009;

Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, *et al.* Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BubR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *J Pathol*, 2003; 200 (1):16-22.

Greene LM, Campiani G, Lawler M, Williams DC e Zisterer DM. BubR1 is required for a sustained mitotic spindle checkpoint arrest in human cancer cells treated with tubulin-targeting pyrrolo-1,5-benzoxazepines. *Mol Pharmacol*, 2008; 73 (2):419-30.

Ha GH, Baek KH, Kim HS, Jeong SJ, Kim CM, McKeon F, *et al.* p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res*, 2007; 67 (15):7155-64.

Harris L, Davenport J, Neale G e Goorha R. The mitotic checkpoint gene BubR1 has two distinct functions in mitosis. *Exp Cell Res*, 2005; 308 (1):85-100.

Hashibe M, Straif K, Tashkin DP, Morgenstern H, Greenland S e Zhang ZF. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol*, 2005; 35 (3):265-75.

Heise A. The clinical significance of HPV. *Nurse Pract*, 2003; 28 (10):8-19; quiz 20-1.

Hennessey PT, Westra WH e Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*, 2009; 88 (4):300-6.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95 (23):1772-83.

Hickman ES, Picksley SM e Vousden KH. Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene*, 1994; 9 (8):2177-81.

Hindle I, Downer MC e Speight PM. The temporal and spatial epidemiology of lip cancer in England and Wales. *Community Dent Health*, 2000; 17 (3):152-60.

Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, *et al.* Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett*, 2005a; 218 (2):199-206.

- Hoffmann M, Gottschlich S, Gorogh T, Lohrey C, Schwarz E, Ambrosch P, *et al.* Human papillomaviruses in lymph node neck metastases of head and neck cancers. *Acta Otolaryngol*, 2005b; 125 (4):415-21.
- Hoffmann M, Orlamunder A, Sucher J, Gottschlich S, Gorogh T, Fazel A, *et al.* HPV16 DNA in histologically confirmed tumour-free neck lymph nodes of head and neck cancers. *Anticancer Res*, 2006; 26 (1B):663-70.
- Holt SV, Vergnolle MA, Hussein D, Wozniak MJ, Allan VJ e Taylor SS. Silencing Cenp-F weakens centromeric cohesion, prevents chromosome alignment and activates the spindle checkpoint. *J Cell Sci*, 2005; 118 (Pt 20):4889-900.
- Hoyt MA, Totis L e Roberts BT. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 1991; 66 (3):507-17.
- Hsu NY, Cheng YW, Chan IP, Ho HC, Chen CY, Hsu CP, *et al.* Association between expression of human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein and survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 2009; 21 (1):81-7.
- Huibregtse JM, Scheffner M e Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, 1993; 13 (8):4918-27.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans: Tobacco smoking. 1986; v.38, 1-421.
- _____. International Agency for Research on Cancer. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines. 2004; Lyon: IARC Press
- _____. International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans: Human Papillomaviruses. 2007; v.90, 1-689.
- INCA. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2007:94
- Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M e Paavonen J. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol*, 1997; 89 (1):81-4.
- Jackman MR e Pines JN. Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv*, 1997; 29 47-73.
- Jin DY, Spencer F e Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell*, 1998; 93 (1):81-91.
- Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D e Taylor SS. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci*, 2004; 117 (Pt 8):1577-89.
- Jones DL, Alani RM e Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*, 1997; 11 (16):2101-11.

- Kabsch K e Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 2002; 76 (23):12162-72.
- Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc*, 2007; 82 (7):878-87.
- Kastan MB e Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004; 432 (7015):316-23.
- Khalili J. Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. *Exp Oncol*, 2008; 30 (4):259-64.
- Kim HS, Jeon YK, Ha GH, Park HY, Kim YJ, Shin HJ, *et al.* Functional interaction between BubR1 and securin in an anaphase-promoting complex/cyclosomeCdc20-independent manner. *Cancer Res*, 2009; 69 (1):27-36.
- Kim S, Park SY, Yong H, Famulski JK, Chae S, Lee JH, *et al.* HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene*, 2008; 27 (24):3457-64.
- Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, *et al.* HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008; 265 Suppl 1 S75-82.
- Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S e Kameyama Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 2002; 38 (6):591-6.
- Kops GJ, Weaver BA e Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5 (10):773-85.
- Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, *et al.* Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*, 2007; 43 (2):181-6.
- Lai CH, Chang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chao A, Yang JE, *et al.* Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin Oncol*, 2007; 25 (24):3628-34.
- Lavia P, Mileo AM, Giordano A e Paggi MG. Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene*, 2003; 22 (42):6508-16.
- Laytragoon-Lewin N, Nilsson PJ, Castro J, Gharizadeh B, Nyren P, Glimelius B, *et al.* Human papillomavirus (HPV), DNA aberrations and cell cycle progression in anal squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res*, 2007; 27 (6C):4473-9.
- Lee CH, Wu DC, Lee JM, Wu IC, Goan YG, Kao EL, *et al.* Carcinogenetic impact of alcohol intake on squamous cell carcinoma risk of the oesophagus in relation to tobacco smoking. *Eur J Cancer*, 2007; 43 (7):1188-99.
- Lee D, Sohn H, Kalpana GV e Choe J. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, 1999; 399 (6735):487-91.
- Lee YK, Choi E, Kim MA, Park PG, Park NH e Lee H. BubR1 as a prognostic marker for recurrence-free survival rates in epithelial ovarian cancers. *Br J Cancer*, 2009; 101 (3):504-10.

- Lee YS, Rhim CC, Lee HN, Lee KH, Park JS e Namkoong SE. HPV status in sentinel nodes might be a prognostic factor in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2007; 105 (2):351-7.
- Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, *et al.* High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (9):3341-5.
- Li X e Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*, 1996; 70 (7):4509-16.
- Liu B, Liang MH, Kuo YL, Liao W, Boros I, Kleinberger T, *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes unscheduled degradation of Pds1p/securin and Clb2p/cyclin B1 and causes chromosomal instability. *Mol Cell Biol*, 2003; 23 (15):5269-81.
- Llamas-Martinez S, Esparza-Gomez G, Campo-Trapero J, Cancela-Rodriguez P, Bascones-Martinez A, Moreno-Lopez LA, *et al.* Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer Res*, 2008; 28 (6A):3733-41.
- Llewellyn CD, Johnson NW e Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol*, 2001; 37 (5):401-18.
- Loo YM e Melendy T. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol*, 2004; 78 (4):1605-15.
- Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, *et al.* Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients--a prospective study. *Gynecol Oncol*, 2007; 104 (3):721-6.
- Luo CW, Roan CH e Liu CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2007; 36 (2):153-8.
- Madkan VK, Cook-Norris RH, Steadman MC, Arora A, Mendoza N e Tyring SK. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. *Br J Dermatol*, 2007; 157 (2):228-41.
- Mammas IN, Sourvinos G, Giannoudis A e Spandidos DA. Human papilloma virus (HPV) and host cellular interactions. *Pathol Oncol Res*, 2008; 14 (4):345-54.
- Mao Y, Abrieu A e Cleveland DW. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell*, 2003; 114 (1):87-98.
- Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer*, 2007; 43 (2):415-32.
- Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E e Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006; 15 (4):774-81.

- Massano J, Regateiro FS, Januario G e Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006; 102 (1):67-76.
- Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, Izumi H, Matsumoto H, Ito E, *et al.* Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am J Med Genet A*, 2006; 140 (4):358-67.
- McCullough MJ e Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J*, 2008; 53 (4):302-5.
- McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med*, 2000; 20 (2):383-406.
- McPhillips MG, Ozato K e McBride AA. Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol*, 2005; 79 (14):8920-32.
- Menezes MB, Lehn CN e Goncalves AJ. Epidemiological and histopathological data and E-cadherin-like prognostic factors in early carcinomas of the tongue and floor of mouth. *Oral Oncol*, 2007; 43 (7):656-61.
- Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS e Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg*, 1998; 176 (5):428-9.
- Miller CS e 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; 91 (6):622-35.
- Moscufo N, Sverdrup F, Breiding DE e Androphy EJ. Two distinct regions of the BPV1 E1 replication protein interact with the activation domain of E2. *Virus Res*, 1999; 65 (2):141-54.
- Musacchio A e Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002; 3 (10):731-41.
- Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, *et al.* Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol*, 2008; 44 (5):446-54.
- Nagler R e Dayan D. The dual role of saliva in oral carcinogenesis. *Oncology*, 2006; 71 (1-2):10-7.
- Nagpal JK e Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*, 2003; 39 (3):213-21.
- Nagpal JK, Patnaik S e Das BR. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer*, 2002; 97 (5):649-53.
- Nair S e Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis*, 2005; 11 (6):350-9.

Napier SS e Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*, 2008; 37 (1):1-10.

Narisawa-Saito M e Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*, 2007; 98 (10):1505-11.

Nelson BS e Heischouer B. Betel nut: a common drug used by naturalized citizens from India, Far East Asia, and the South Pacific Islands. *Ann Emerg Med*, 1999; 34 (2):238-43.

Nemes JA, Deli L, Nemes Z e Marton JJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006; 102 (3):344-52.

Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C e Marton JJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res*, 2008; 14 (1):85-92.

Nichols AC, Faquin WC, Westra WH, Mroz EA, Begum S, Clark JR, *et al.* HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009; 140 (2):228-34.

Nigg EA. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol*, 1998; 10 (6):776-83.

Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K e Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol*, 1995; 69 (7):4489-94.

Oh ST, Kyo S e Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol*, 2001; 75 (12):5559-66.

Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Souza LB, Medeiros SR e Costa Ade L. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx*, 2009; 36 (4):450-6.

Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K e Barten M. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol*, 2003a; 192 (3):145-8.

_____. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. . Berl), v.192. 2003b. p.145-48 p. (*Med Microbiol Immunol*)

Ouyang B, Knauf JA, Ain K, Nacev B e Fagin JA. Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BubR1. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002; 56 (3):341-50.

Pan SH, Tai CC, Lin CS, Hsu WB, Chou SF, Lai CC, *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. *Carcinogenesis*, 2009; 30 (2):366-75.

Parker GA, Touitou R e Allday MJ. Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene*, 2000; 19 (5):700-9.

- Peedicayil A, Sathish N, Gnanamony M, John S, Viswanathan FR, Naseema PS, *et al.* Can recurrence of cervical cancer be predicted by human papillomavirus DNA in nodes or plasma? *J Low Genit Tract Dis*, 2009; 13 (2):102-6.
- Perea-Milla Lopez E, Minarro-Del Moral RM, Martinez-Garcia C, Zanetti R, Rosso S, Serrano S, *et al.* Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer*, 2003; 88 (11):1702-7.
- Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, 2002; 9 (5):931-43.
- _____. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006; 7 (9):644-56.
- Pfister H e Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*, 1994; 37 (3-4):143-9.
- Phillips DH. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*, 2002; 23 (12):1979-2004.
- Picconi MA, Eijan AM, Distefano AL, Pueyo S, Alonio LV, Gorostidi S, *et al.* Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol*, 2000; 61 (1):65-9.
- Pinto M, Vieira J, Ribeiro FR, Soares MJ, Henrique R, Oliveira J, *et al.* Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BubR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. *Cell Oncol*, 2008; 30 (5):389-95.
- Preti MCG. Proteínas de resposta imunológica e metástase associadas a carcinogênese do colo uterino e a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Departamento de Patologia 2009.
- Rashband W. ImageJ USA: National Institutes of Health.
- 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; 104 (3):336-44.
- Rivero ER e Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res*, 2006; 20 (1):21-4.
- Roberts S, Ashmole I, Rookes SM e Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*, 1997; 71 (5):3554-62.
- Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, 2004; 40 (2):207-13.
- Ruchaud S, Carmena M e Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8 (10):798-812.

- Saeki A, Tamura S, Ito N, Kiso S, Matsuda Y, Yabuuchi I, *et al.* Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2002; 94 (7):2047-54.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230 (4732):1350-4.
- Sand L, Jalouli J, Larsson PA e Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer Res*, 2000; 20 (2B):1183-8.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E e Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994; 17 (5):914-21.
- Sarafi TR e McBride AA. Domains of the BPV-1 E1 replication protein required for origin-specific DNA binding and interaction with the E2 transactivator. *Virology*, 1995; 211 (2):385-96.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ e Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 1990; 63 (6):1129-36.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G e Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, 2005; 15 (5):727-46.
- Scully C e Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*, 2009;
- Scully C e Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol*, 2007; 43 (2):107-15.
- Scully C e Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol*, 2000; 1 (1):37-42.
- Scully C, Field JK e Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*, 2000; 36 (3):256-63.
- Scully C, Porter S. . ABC of oral health. Oral cancer. *BMJ*, 2000.; 321 (7253):97-100.
- Seike M, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Okano T, Kurimoto F, *et al.* The promoter region of the human BubR1 gene and its expression analysis in lung cancer. *Lung Cancer*, 2002; 38 (3):229-34.
- Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Vakevainen S e Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001; 25 (5 Suppl ISBRA):137S-143S.
- Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN, *et al.* Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. *Head Neck*, 2009;
- Shichiri M, Yoshinaga K, Hisatomi H, Sugihara K e Hirata Y. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBubR1 and their relationship to survival. *Cancer Res*, 2002; 62 (1):13-7.

Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA e Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med*, 2008; 37 (10):593-8.

Slama J, Drazd'akova M, Fischerova D, Svarovsky J, Freitag P, Zikan M, *et al.* [Detection of HPV DNA in lymph nodes in early stages cervical cancers]. *Ceska Gynekol*, 2008; 73 (4):217-21.

Soares CP, Benatti Neto C, Fregonezi PA, Teresa DB, Santos RT, Longatto Filho A, *et al.* Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. *Anal Quant Cytol Histol*, 2003; 25 (1):19-24.

Soares CP, Dos Reis RI, Kimura SS, Teresa DB, Neto CB, Longatto-Filho A, *et al.* Papilomavírus humano (HPV) em lesões benignas e malignas de mucosa oral pelos métodos de hibridização in situ e imunohistoquímica. *Rev. Cienc. Farm.*, 2002a; 23

Soares CP, Malavazi I, dos Reis RI, Neves KA, Zuanon JA, Benatti Neto C, *et al.* [Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2002b; 35 (5):439-44.

Soares RC, Oliveira MC, de Souza LB, Costa Ade L e Pinto LP. Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients. *J Appl Oral Sci*, 2008; 16 (5):340-4.

Sobin LH e Wittekind C. UICC - International Union Against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumours. 6th Ed. New York: John Wiley & Sons. 2002. 1-264 p.

Sousa R, Dostatni N e Yaniv M. Control of papillomavirus gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1032 (1):19-37.

Stanley MA, Pett MR e Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35 (Pt 6):1456-60.

Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, *et al.* Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res*, 2002; 8 (4):1093-100.

Sudo T, Nitta M, Saya H e Ueno NT. Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*, 2004; 64 (7):2502-8.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M e Ishikawa T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003; 95 (5):594-600.

Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Higashikawa K, *et al.* Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2007; 45 (2):116-22.

Sundqvist K e Grafstrom RC. Effects of areca nut on growth, differentiation and formation of DNA damage in cultured human buccal epithelial cells. *Int J Cancer*, 1992; 52 (2):305-10.

Swiss Institute of Bioinformatics. ViralZone. [citado jul 2009]. Disponível em: <http://www.expasy.ch/viralzone>

- Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S e Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, 1983; 12 (6):418-24.
- Tachezy R, Klozar J, Salakova M, Smith E, Turek L, Betka J, *et al.* HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis*, 2005; 11 (3):181-5.
- Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Yokoe T, Koike Y, Morimoto Y, *et al.* Mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and BubR1, in oesophageal squamous cancer cells and their association with 5-fluorouracil and cisplatin-based radiochemotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008; 20 (8):639-46.
- Taylor SS, Ha E e McKeon F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, 1998; 142 (1):1-11.
- Taylor SS, Scott MI e Holland AJ. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res*, 2004; 12 (6):599-616.
- Tong SY, Lee YS, Park JS e Namkoong SE. Human papillomavirus genotype as a prognostic factor in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*, 2007; 17 (6):1307-13.
- Torrente MC e Ojeda JM. Exploring the relation between human papilloma virus and larynx cancer. *Acta Otolaryngol*, 2007; 127 (9):900-6.
- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G e Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*, 2007; 43 (6):523-34.
- Versteeg PA, Slot DE, van der Velden U e van der Weijden GA. Effect of cannabis usage on the oral environment: a review. *Int J Dent Hyg*, 2008; 6 (4):315-20.
- Vousden KH. Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Adv Cancer Res*, 1994; 64 1-24.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999; 189 (1):12-9.
- Walker DM, Boey G e McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology*, 2003; 35 (5):376-83.
- Warnakulasuriya S. Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol*, 2002; 7 (1):127-32.
- Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H, *et al.* Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med*, 2008; 37 (3):157-65.
- Watson RA, Thomas M, Banks L e Roberts S. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J Cell Sci*, 2003; 116 (Pt 24):4925-34.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995; 81 (3):323-30.

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, *et al.* Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*, 2006; 24 (5):736-47.

Weiss E e Winey M. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol*, 1996; 132 (1-2):111-23.

Worrall SF. Oral Cancer – An Overview 2001.

Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*, 2002; 38 (8):737-46.

Wynder EL e Bross IJ. Aetiological factors in mouth cancer; an approach to its prevention. *Br Med J*, 1957; 1 (5028):1137-43.

Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, *et al.* Overexpression of BubR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007; 174 (1):42-7.

Yoon J, Kang Y, Kim K, Park J e Kim Y. Identification and purification of a soluble region of BubR1: a critical component of the mitotic checkpoint complex. *Protein Expr Purif*, 2005; 44 (1):1-9.

You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K e Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 2004; 117 (3):349-60.

Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, *et al.* Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res*, 2006; 12 (2):405-10.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW e Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 1996; 13 (11):2323-30.

Zhang B, Spandau DF e Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol*, 2002; 76 (1):220-31.

Zhang ZY, Sdek P, Cao J e Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004; 33 (1):71-4.

Zheng ZM e Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 2006; 11 2286-302.

Zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996; 122 (1):3-13.

_____. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92 (9):690-8.

_____. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2 (5):342-50.

Anexos

Anexo A
(Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2007

Ofício nº 3853/2007
CEP/SPC

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA NA CARCINOGENESE BUCAL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 257ª Reunião Ordinária realizada em 22/10/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 9802/2007.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa..

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
RÉGIA CAROLINA PEIXOTO LIRA
PROF. DR. EDSON GARCIA SOARES (Orientador)
Depto. de Patologia – FMRP-USP

Anexo B
(Reagentes e Soluções para Imunoistoquímica)

- ***Polinização das lâminas***

4ml Poli-L-lysine
480ml Água destilada

- Lavar as lâminas em Extran MA 02 (Merck);
- Secar em estufa;
- Mergulhar na solução de poli-lisina por 2 minutos;
- Escorrer bem e secar em estufa.

Obs.: A solução de poli-lisina deve ser guardada em geladeira, podendo polinizar até mil lâminas.

- ***Solução Tris-EDTA Ph 9.0***

0,121g Tris-(hidroximetil)-aminometano
0,037g EDTA
100ml Água destilada

- Misturar todas as substâncias e acertar o Ph. Se for necessário, armazenar sob refrigeração.

- ***Solução PBS (Phosphate Buffered Saline) 0.1M Ph 7.4***

16,34g Cloreto de sódio (NaCl)
0,72g Fosfato de sódio Monobásico
2,1g Fosfato de sódio Dibásico
2000ml Água destilada

- Misturar todas as substâncias e acertar o Ph. Se for necessário, armazenar sob refrigeração;
- Volume aproximado de 500ml para cada 100 lâminas

- ***Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) a 3%***

10ml H_2O_2 30 vol
90ml PBS

- Preparar a solução e conservar sob refrigeração.

- ***Solução de Albumina Bovina (BSA)***

1g BSA
100ml PBS

- Preparar a solução e congelar em alíquotas;
- Utilizada para diluição de anticorpos primários e secundários.

- ***Solução de DAB (diaminobenzidina)***

5mg DAB
5 ou 8ml PBS (dependendo do número de lâminas na reação)
120µl H₂O₂

- Dissolver o DAB.

Obs.: DAB pode ser perigoso se engolido, inalado ou absorvido através da pele. Além de ser um potencial agente cancerígeno.

- ***Solução Hematoxilina de Harris***

5g Hematoxilina cristais
50ml Álcool absoluto
100g Álumen de Potássio ou Amônia
1000ml Água destilada
2,5g Óxido vermelho de mercúrio

- Dissolver a hematoxilina no álcool e o Álumen na água destilada quente;
- Misturar ambas as soluções e ferver rápido (menos de 1 minuto);
- Remover o balão volumétrico do fogareiro e acrescentar o Óxido vermelho de mercúrio;
- Tornar a aquecer até solução ficar cor púrpura escuro;
- Retirar imediatamente e resfriar a solução em recipiente com água. Em seguida, filtrar e armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Obs.: Ressalta pormenores nucleares.

Anexo C

(Soluções e Protocolo para Extração de DNA)

- **Soluções:**

Fórmula utilizada: $\text{Conc.1} \times \text{Vol. 1} = \text{Conc.2} \times \text{Vol.2}$

- Xilol
- Álcool absoluto
- Lise I (tampão) lise de MP
- Lise II (tampão) lisa célula e libera DNA
- Proteinase K (digestão de restos celulares)

- **Lise I**

- Tris/Hcl 0,5M Ph7,6
- MgCl_2 1 Molar (não precisa ajustar Ph)
- Triton X-100 (compra-se pronto)
- Sacarose (só pesar)

Reagentes	Volume final			
	1litro	500ml	200ml	100ml
Tris/Hcl 0,01M Ph7,6	20ml	10ml	4ml	2ml
Mgcl₂ 2,5mM	2,5ml	1,25ml	0,5ml	0,250ml
Triton X-100 1%	10ml	5ml	2ml	1ml
Sacarose 0,32M	110g	55g	22g	11g

- Completar o volume c/ H_2O miliQ

Obs.: fazer mais ou menos 80ml → ajustar Ph 7,6 com Hcl

Tris: Peso Molecular p. ex. 203 → 203g - 1000ml - 1M
 20,3g - 100ml - 1M
 10,15g - 100ml - 0,5M
 X - 1000ml

- ***Lise II***

- Tris/Hcl 0,5M Ph 8,5
- Mgcl₂ 1 Molar (não precisa ajustar Ph)
- Kcl 2 Molar
- NP – 40 100% (compra-se pronto)
- Tween – 20 100% (compra-se pronto)

Reagentes	Volume final			
	1litro	500ml	200ml	100ml
Tris/Hcl 0,01M Ph 8,5	20ml	10ml	4ml	2ml
Kcl 50mM	25ml	12,5ml	5ml	2,5ml
Mgcl₂ 2,5mM	2,5ml	1,25ml	0,5ml	0,250ml
NP-40 1%	10ml	5ml	2ml	1ml
Tween-20 1%	10ml	5ml	2ml	1ml

- Completar o volume c/ H₂O miliQ

- ***Proteinase K (PK)***

Proteinase K	Volume final			
	10ml	5ml	2ml	1ml
10mg/ml	100mg	50mg	20mg	10mg

- Completar o volume c/ H₂O miliQ

- **Protocolo de extração de DNA**

1. Um corte de 5µm (micra)
Acrescentar 1 ml de xilol
Aquecer a 65°C por 10 min
Centrifugar (12 000 rpm por 2min) e descartar o sobrenadante
→ repetir estes passos até a retirada total da parafina
2. Acrescentar ao tecido 750µl de xilol + 250µl de álcool absoluto
Centrifugar e descartar o sobrenadante
3. Acrescentar ao tecido 500µl de xilol + 500µl de álcool absoluto
Centrifugar e descartar o sobrenadante
4. Acrescentar ao tecido 250µl de xilol + 750µl de álcool absoluto
Centrifugar e descartar o sobrenadante
→ utilizar um volume total de 500µl quando o corte for pequeno. Nas proporções 350 µl para 150µl e 250µl para 250µl
5. Acrescentar ao tecido 1000µl de álcool absoluto
Centrifugar e descartar o sobrenadante
→ lavar 2 vezes em álcool absoluto
→ utilizar um volume total de 500µl quando o corte for pequeno
6. Acrescentar ao tecido 1000µl de lise I
Centrifugar e descartar o sobrenadante
→ lavar duas vezes com Lise I antes da Lise II e PK
7. Ressuspender o tecido em 300µl de Lise II mais 5µl de Proteinase K (por amostra)
→ em cortes pequenos colocar na proporção de 100µl de Lise II para 10µl de PK
8. Encubar a 65°C por 2 horas ou mais
9. Inativar a Proteinase K (94°C por 10 minutos)
10. Estocar a amostra a - 20°C

Anexo D
(Reagentes e Soluções para Eletroforese)

- ***Acrilamida – Solução mãe***

290g Acrilamida
10g Bis-acrilamida
1ℓ Água destilada

- Misturar todas as substâncias, filtrar e armazenar em recipiente coberto com papel alumínio sob refrigeração.

- ***EDTA Ph 8.0 (100ml)***

18,6g EDTA
100ml Água destilada

- Dissolver o EDTA, acertar o Ph, autoclavar e armazenar sob refrigeração.

- ***Solução TBE 10x (0.9M, Ph 8.0 – 1ℓ)***

108g Tris base (PM = 121.1)
53g Ácido bórico
40ml EDTA Ph 8.0
x Água destilada para completar o volume de 1000ml

- Completar o volume de EDTA com água destilada para 400ml (40ml EDTA + 360ml água destilada);

- Dissolver o Ácido bórico e Tris base na solução de EDTA e completar o volume com água destilada;

- Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

- ***Mix para gel não desnaturante 10% - Solução uso (200ml)***

66,67ml Solução de Acrilamida preparada anteriormente
97,43ml Água destilada
20ml TBE 10x preparado anteriormente
14ml Glicerol

- Misturar todas as substâncias por alguns minutos em uma garrafa para cultura de células de 270ml e armazenar à temperatura ambiente.

- ***Gel de poliacrilamida***

20ml Mix para gel não desnaturante 10%
20ml TEMED
350µl Persulfato de potássio

- Misturar todas as substâncias, aplicar nas placas de vidro, encaixar os pentes e aguardar a polimerização do gel.

- ***Tampão de corrida para eletroforese***

100ml TBE 10x
900ml Água destilada

- Misturar em uma proveta e colocar em ambos os pólos da cuba de eletroforese.

- ***Marcador de Peso Molecular***

5µl Marcador de peso molecular
50 µl *Loading buffer*
150 µl Água destilada

- Misturar todas as substâncias em um microtubo e armazenar sob refrigeração.

- ***Solução Fixadora (5 l)***

856ml Álcool etílico
35ml Ácido acético
4 165ml Água destilada

- Misturar todas as substâncias e armazenar em recipiente âmbar sob o abrigo da luz à temperatura ambiente.

- ***Solução de Prata 20%***

20g Nitrato de prata
100ml Água destilada

- Diluir a prata em água destilada e armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente sob abrigo de luz.

- ***Solução Reveladora (4 l)***

90g Hidróxido de Sódio (NaOH)
4 l Água destilada

- Dissolver o NaOH sob agitação constante em béquer tampado e armazenar em recipiente âmbar sob o abrigo da luz à temperatura ambiente.

Anexo E
(Artigo científico enviado para publicação)

Running title: BUBR1 expression and oral lesions HPV-infected.

**BubR1 expression in benign oral lesions and squamous cell carcinomas:
correlation with Human Papillomavirus.**

Régia C. P. Lira¹, Fabiana A. Miranda¹, Márcia C. M. Guimarães¹, Renata T. Simões⁴, Eduardo A. Donadi², Christiane P. Soares³ and Edson G. Soares¹

¹*Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP. Av. Bandeirantes, 3900, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brazil.*

²*Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP.*

Av. Bandeirantes, 3900 (6º andar do HC), CEP: 14048-900, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

³*Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP.*

Rua Expedicionários do Brasil, 1621, CEP: 14801902, Centro, Araraquara-SP, Brazil.

⁴*Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte.*

Av. Francisco Sales, 1111; Ala D; 9º andar. Santa Efigênia. CEP: 30150-22, Belo Horizonte-MG, Brazil.

Address for correspondence:

Edson Garcia Soares

Departamento de Patologia,

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP

Avenida Bandeirantes, 3900, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 16 36023179 ; E-mail: egsoares@fmrp.usp.br

Abstract

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common head and neck cancer. Only in Brazil, the estimate is that 14,160 new diagnoses will be made in 2009. HPV is associated with increasing risk of oral cancer, but its role in carcinogenesis is still controversial. BUBR1, an important protein in the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC), has been associated with some virus-encoded proteins and cancer. The aim of the present study was to evaluate the expression of BUBR1 in non-malignant oral lesions and OSCC with and without metastasis associated with HPV infection. We performed immunohistochemistry for BUBR1 in 70 OSCC biopsies divided into three groups (in situ tumors, invasive tumors without metastasis and invasive tumors with metastasis) with their respective lymph nodes from samples with metastasis and in 16 non-malignant oral lesions. Nested PCR was performed in order to detect HPV DNA. Significantly higher BUBR1 expression associated with shorter survival ($p = 0.0479$) was observed in malignant lesions. There was also a significant correlation ($r = 1.000$) with BUBR1 expression in lesions with metastasis and their lymph nodes. Ninety percent of OSCC and 100% of benign lesions were HPV positive. HPV16 and HPV18 were present in 13% and 24% of HPV-positive OSCC samples, respectively. HPV was more prevalent (76%) in samples with high BUBR1 expression and the absence of viral DNA had no influence on BUBR1 expression. These findings suggest that HPV could be associated with overexpression of BUBR1 in OSCC, but not in benign oral lesions.

Key Words: BUBR1, HPV, Oral squamous cell carcinoma.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common head and neck cancer and occupies eighth position in cancer incidence worldwide, with an estimated annual incidence of more than 170,000 new cases (1-3). Only in Brazil, the estimate is that 14,160 new diagnoses will be made in 2009 (4). OSCC is a disease particularly occurring in low income communities and among older men, with a mean age at diagnosis of 62.0 years and a male:female ratio between 1.3:1 and 2:1 (5). Tobacco and/or alcohol are recognized as the major risk factors associated with oral carcinogenesis, but several studies have shown that human papillomavirus (HPV) is associated with increasing risk of oral cancer, independently of exposure to tobacco and alcohol (6-9). The role of HPV in oral carcinogenesis is still controversial because of different frequencies detected (0%-100%) (10, 11). Some studies report more prevalence of high-risk HPV types 16 and 18 in malignant and potentially malignant oral lesions, but other authors have not detected an association between these types of HPV and the type of oral lesion (12-16).

The oncoproteins E6 and E7 from HPV can be viewed as oncogenic factors which can disrupt checkpoint controls and interfere in major control pathways of cell cycle and apoptosis,

thereby inducing mitotic abnormalities and increasing genomic instability (17). Some studies show that karyotypes of OSCC are near-triploid and present a lot of structural and numerical abnormalities that could influence chromosomal segregation (6, 18-20). BUBR1 is an important protein in the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC), a checkpoint that protects the cell from chromosome missegregation and aneuploidy during mitosis. Individuals with missense or truncating mutations in the BUBR1 gene are predisposed to the development of childhood cancer including rhabdomyosarcoma, Wilms tumor, and leukemia (21). However, BUBR1 mRNA and/or protein overexpression has been found to be associated with tumor recurrence and progression of renal and bladder cancer (22, 23), and was also observed in malignant salivary gland tumors and in breast and gastric cancer (24-26).

Since HPV has been cited as a risk factor of oral carcinogenesis, and since some studies have shown the association between viral proteins and the BUBR1 (22, 27), the aim of the present study was to evaluate the expression of BUBR1 immunoperoxidase in non-malignant oral lesions and in OSCC with and without metastasis associated with HPV infection. An additional objective was to compare quantitative analyses of BUBR1 performed with a computer-assisted system to quantification by a pathologist.

Material and Methods

Specimens

Eighty-six biopsies of oral lesions were selected from the archives of the Pathology Department, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Brazil. The study was approved by Research Ethics Committee of HCFMRP-USP, project number 9802/07. We selected 16 non-malignant oral lesions (OL^{NM}), 20 *in situ* oral squamous cell carcinomas (OSCC^{IS}), 27 invasive oral squamous cell carcinomas without metastases (OSCC^{WT}) and 23 invasive oral squamous cell carcinomas with metastases (OSCC^W). In addition, 23 cervical lymph nodes (LN) from the patients with OSCC^W were also evaluated. Thin 5 µm sections were cut, placed on organosilane-pretreated slides and submitted to immunohistochemical assays (BUBR1). Additionally, two sections of 10 µm were cut for DNA extraction and HPV typing. Clinicopathological information about the patients such as age, sex, history of smoking and alcohol consumption was obtained from the patients' medical records.

Immunohistochemistry for BUBR1

Immunohistochemistry was performed for the detection of BUBR1 protein using the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom). Paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylene and then rehydrated through a graded alcohol series. For antigen retrieval, the sections were immersed in Tris-EDTA buffer, pH 9.0, and submitted to steam heating for 35 minutes at 98 °C. The sections were cooled at room temperature

and incubated for 20 min in a 3% H₂O₂ solution to block endogenous peroxidase activity. After rinsing 3 times in 1 M standard phosphate buffered saline (PBS) baths, the sections were incubated in 2% horse serum for 30 min to reduce nonspecific antibody binding and with a primary antibody raised against BUBR1 overnight (Mouse monoclonal, 1:100; Abcam – ab54894, Cambridge, UK). After incubation with the primary antibody, the slides were rinsed with PBS 3 times and immunoperoxidase staining was performed using a biotinylated secondary antibody and the streptavidin-peroxidase complex (Novocastra), each step for 30 min. Between the stages described above, the sections were carefully rinsed 3 times with PBS. Subsequently, the sections were incubated in a solution containing 5 mg of diaminobenzidine (GIBBICO, Gaithersburg, Maryland, USA) dissolved in 5 ml of PBS and 120 µL of hydrogen peroxide. The DAB reaction was blocked with one wash of PBS followed by rinses in distilled water. The sections were then counterstained with Harris' hematoxylin for 1 min, rinsed with distilled water, dehydrated with three absolute alcohol washes, immersed twice in xylene and mounted on Permount mounting medium (MERCK, Darmstadt, Germany). All the steps were performed at room temperature. A normal tonsil, which is an accessible tissue containing highly proliferative cells in its germinal centers, was chosen as a positive control sample (28). A negative control sample was performed by replacing the specific primary antibody with PBS.

Qualitative immunolabeling evaluation

Scoring and qualitative interpretation of immunohistochemical results were carried out by an experienced pathologist and data were classified as negative, discrete, moderate or intense immunolabeling. We considered the expression of BUBR1 to be low when the cells from the oral lesions were negative or showed discrete immunostaining. BUBR1 expression was classified as high when the pathologist observed moderate or intense immunolabeling.

Image acquisition and quantitative BUBR1 evaluation

Positive cytoplasm was automatically quantified by a computer-assisted system (Image-Pro Plus - Cybernetics, MD, USA) consisting of a microscope, a digital camera and a software package. A mean of ten random microscope fields were selected in order to analyze 1000 cytoplasm fields per biopsy in all patient sections. The images of the sections of 70 patients with oral carcinoma, 16 benign lesions and cervical lymph node biopsies were acquired on an electron photomicrograph and were then processed and analyzed by the software. For each slide, the digitized image segmentation was controlled interactively by the RGB color filter existing in the software program. The automatic cytoplasm count was determined and expressed as percentage.

HPV detection and typing

Genomic DNA was obtained according to the protocol proposed by Bettini *et al.*, (29) modified. For generic HPV amplification by PCR the GP5+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT

AC TAC-3') and GP6+ (3'-CTT AT ACT AAA TGT CAA ATA AAA AG-5') primers, which amplify a 150 bp DNA fragment, were used (30). As an internal control of amplification and to evaluate the efficacy of DNA extraction, the amplification of generic HPV was performed together with primers for the human beta-globin gene (PCO3+ 5'-CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3') and (PCO4+ 3'-CCA CTT GCA CCT ACT TCA ACA CCA CT-5')(31). The generic HPV-positive samples were amplified with specific primers for HPV16 (E7.667 5'-GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC-3' and E7.774 3'-CGA AGC CAA CAC GCA TGT TTC G-5') and HPV18 (E7.696 5'-AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG GA-3' and E7.779 3'-ACA CAA CAT TCA CAC TTC GG-5') as described by Walboomers *et al.*(32). The reaction mixture included 2 µl of genomic DNA, 20 mM deoxynucleoside triphosphate (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 10 pmol/µl of each primer (IDT, IA, USA), 1.25 U Taq polymerase (Invitrogen, Brazil), 0.75 mM MgCl₂, 3.5 µl of 10x buffer (Invitrogen, Brazil), and distilled deionized H₂O to complete a total volume of 23 µl. The cycling conditions for almost all generic and HPV types consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, at 55°C for 1 min, and at 72°C for 1 min, with a final extension cycle of 72°C for 10 min. PCR products were separated on 10% nondenaturing polyacrylamide gels followed by silver staining, as described by Sanguinetti *et al.*(33). The positive PCR control was HPV-positive DNA collected from cervical samples. As a negative control, all PCR reagents were added to an Eppendorf tube containing no DNA sample.

Statistical Analysis

The distributions of three clinical parameters were compared between the different groups by means of the two-sided Fisher exact test (2×2 contingency tables) with the aid of the GraphPad InStat software, which was also used to estimate the odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (95% C.I.). Age, reported as arithmetic mean and standard deviation, was also compared between groups by means of the two-sided unpaired Student t-test.

Qualitative differences in BUBR1 expression related to clinicopathologic features in the groups were evaluated by means of the Fisher exact test (in case of 2x2 tables) using the GraphPad InStat software or by an exact test that uses the Metropolis algorithm to obtain an unbiased estimate of the exact P value and its standard error (in case of more complex RxC tables) using the RXC software. For quantitative analysis, since the BUBR1 expression data passed the Kolmogorov-Smirnov normality test (KS), parametric analyses were performed using one-way ANOVA with the Tukey-Kramer multiple comparisons post test and the unpaired t test with Welch correction. The correlation between OSCC^w and LN was calculated using the Spearman rank correlation test.

The differences in the prevalence of HPV and HPV types in the different groups were evaluated by an exact test using RXC software and the correlation between BUBR1 expression and HPV prevalence was calculated by the Fisher exact test (in case of 2x2 tables) using the GraphPad InStat software. The comparison of mean of BUBR1 expression between the HPV-positive

malignant groups was evaluated by the unpaired t test with Welch correction and when the data did not pass the normality test, the Mann-Whitney test was used.

Analysis of survival time was performed using Kaplan-Meier curves and differences between curves were evaluated by the Log rank test using the GraphPad Prism version 4.00 for Windows. Cumulative survival was computed from the date of diagnosis or surgery to the documented date of follow-up or death. P-values were two-sided and the level of significance was set at 5% ($\alpha = 0.05$).

Results

Oral Squamous Cell Lesions and clinical parameters

A total of 86 cases of oral lesions were studied in 71 men and 15 women with a mean age of 56.79 years. Tobacco and alcohol exposure was a predominant habit in 80.2% and 66.3% of patients, respectively. Mean age and gender were quite homogeneous among the different groups studied. However, the group of non-malignant oral lesions (OL^{NM}) showed a different behavior compared to the other groups regarding tobacco and alcohol exposure (**Table I**).

Statistical analysis of the clinical parameters demonstrated that there more men had oral carcinomas as a whole, but especially in cases with metastasis, when compared with the non-malignant group. The frequency of tobacco and alcohol consumption was significantly higher in all carcinomas evaluated together than in benign lesions. The groups with *in situ* carcinomas and with metastasis also had significantly more smoking and drinking patients than non-malignant patients. The smoking habit was more frequent among patients with invasive carcinomas without metastasis only when compared with *in situ* carcinomas ($p = 0.0312$) and drinkers were also statistically more common among patients with invasive samples without metastases than in non-malignant ones (**Table II**).

BUBR1 qualitative expression and clinicopathologic features

Immunolabeling of BUBR1 was classified as low and high expression. All samples of the OL^{NM} group showed low expression, while in the malignant lesions ($OSCC^{IS}$, $OSCC^{WT}$ and $OSCC^W$) high expression was observed in 15/20 (75%), 19/27 (70%) and 18/23 (78%) of them, respectively (**Figure 1**). In this study, we observed only immunolabeling of BUBR1 in the cell cytoplasm, as previously reported (28). Even in most cases showing high BUBR1 expression, the relationship between qualitative BUBR1 expression and clinicopathologic features (location, TNM stage, treatment, recurrence and death) did not show a positive association, except regarding location when all malignant samples were analyzed together ($p=0.0078 \pm 0.0003$). We observed that the profile of BUBR1 expression in the tongue was opposite to that in the gums. The tongue showed high expression in 28 out of 33 samples while the majority of gums showed low expression, as

summarized in **Table III**. The immunostaining of cervical LN biopsies with metastasis showed high expression in 15 (65%) out of 23 lymph nodes.

Quantitative expression of BUBR1 in oral lesions

Similar to the qualitative evaluation of BUBR1 expression, quantitative analyses showed a significantly higher number of cells expressing BUBR1 in malignant oral lesions, but not in non-malignant ones. Cervical metastatic lymph nodes presented quite similar expression, as observed in their respective invasive oral lesions (**Figure 2**). Thus, multiple comparisons analysis showed a statistically significant difference between the OL^{NM} group and the other groups studied, as shown in **Table IV**. Although the variance between OSCC^W and their LN was not statistically significant by Wilcoxon matched-pairs analysis ($p = 0.1895$), the correlation between OSCC^W and LN ($p < 0.0001$; $r = 1.000$) was significant.

Human papillomavirus detection and correlation with BUBR1 expression

Of the 86 oral lesions evaluated, 79 (91.9%) were positive for HPV. HPV DNA was also detected in 22/23 (95.6%) lymph nodes, in 100% of the OSCC^W group and in all lesions without carcinoma. With respect to viral type, HPV 16 was detected in 11 (13.9%) cases and in 4 (17.4%) lymph nodes, and HPV 18 was observed in 17 (21.5%) lesions and in 4 (17.4%) lymph nodes. Double infection with both types was found in two cases in the OSCC^{WT} group, in five cases of the OSCC^W group, and in two lymph nodes. There was a significantly higher ($p = 0.000146$) detection rate of HPV 18 in the OSCC^{WT} and OSCC^W groups than in the OSCC^{IS} and OL^{NM} groups.

HPV was more prevalent (76.2%) in the malignant cases with high BUBR1 immunolabeling. The number of HPV-negative cases was equal in samples with high or low expression of BUBR1. Interestingly, we also observed that in some cases presenting koilocytes (HPV-infected cells) the BUBR1 protein was expressed specifically in the cytoplasm of these cells, while in surrounding cells that had no characteristics of koilocytes, the expression was absent (**Figure 1C**).

More HPV 18 was found in carcinomas with high BUBR1 expression, but HPV type 16 and the cases with both HPV types showed similar prevalence according to BUBR1 immunolabeling. Statistical analysis showed no significant association between the presence of HPV and qualitative BUBR1 expression, as summarized in **Table V**. Fifteen lymph nodes showed high expression of BUBR1. Of these, two were type 16 and three were type 18. The other ten lymph nodes were neither 16 or 18 types and therefore were considered as other types. Since all OL^{NM} cases showed a low BUBR1 expression and HPV was found in all cases, this group was not considered for statistical analysis.

Considering only HPV-positive lesions, the comparison of the mean number of labeled cells from cases classified as high and low BUBR1 expression showed that the number of marker cells differed significantly in oral carcinomas with metastasis, in metastatic lymph nodes and when all

malignant cases were analyzed together. In invasive carcinomas without metastasis the difference between means of high and low expression was quite significant, as summarized in **Table VI**.

Survival analysis

After a median follow-up of 25 months, 25 of the 70 patients with malignant oral lesions died. The estimated mean cumulative survival from the date of diagnosis was 24 months for patients with high BUBR1 expression and 28 months for patients with low expression. Thirty of 70 oral carcinomas from the *in situ*, with and without metastasis groups had recurrence within a mean period of 13.5 months after the first diagnosis. None of the 16 patients without oral carcinoma died or presented malignant lesions during a median follow-up of 24 months and all of them showed low BUBR1 expression. Patients with malignant samples with high BUBR1 expression showed a significantly shorter cumulative survival than patients with malignant samples with low expression (log rank test, $p = 0.0479$), as described in **Figure 3**.

No significant difference was observed between the cumulative survival curves for patients with metastatic LN with high and low BUBR1 expression. The comparison of cumulative survival curves for HPV-positive and HPV-negative malignant cases showed no significant difference ($p = 0.5315$). However, patients who presented HPV DNA in their samples had shorter survival than HPV DNA-negative patients. No significant difference in survival curves was observed according to the viral type in oral carcinomas, but patients with HPV18 infection showed the shortest survival, followed by HPV16 and the other types that were not classified. The survival of patients with the presence of HPV16 in lymph nodes was longer than the survival for of patients with HPV18, and patients with lymph nodes containing other viral types presented the shortest overall survival (data not shown).

Discussion

Similar to previous studies in developing nations, the mean age of our patients including the group of non-malignant lesions was 56.79 ± 1.40 years (34, 35). In this study, tobacco exposure was observed in 90% of the patients with OSCC, ranging from 77.8% to 100% intergroup. The profile of our patient regarding tobacco consumption was similar to those detected in some previous studies even in developed countries (9, 35, 36), but other authors also reported a different prevalence (50% - 65.5%) of smoking patients (1, 34, 37). The percent of smokers in OL^{NM} was similar to the control group of a study with young adults performed by Rodriguez *et al.* (38).

Undoubtedly important in OSCC, alcohol increases the risk of OSCC, but how the intensity of alcohol intake determines this risk is unclear. Most of our patients with OSCC (77%; range: 70% to 91.3%) were also alcohol drinkers, in agreement with previous findings in Hungary (75.5%)(37), Brazil (80.9%) and the US (69.8%) (35), but in contrast to some studies that found a lower prevalence of alcohol consumption (1, 9, 34, 38, 39).

HPV has been associated with increased risk of oral cancer regardless of tobacco and alcohol exposure, especially the high-risk types 16 and 18 (6, 7, 40). In this study, 90% of OSCC and 100% of OL^{NM} were HPV positive. A Chinese study on 73 OSCC found a 74% prevalence of HPV (41), while Bouda *et al.* (13) and Furrer *et al.* (12), in studies on smaller samples, detected 95% and 100% HPV positivity, respectively. The results of the present investigation agree with the latter two studies. However, most studies report a range of viral prevalence from 20% to 43% (42-45). HPV prevalence varies from 0 to 55% in normal oral samples and is more than 80% in hyperplasias and dysplastic lesions (8, 14, 41). Our samples without cancer were diagnosed as traumatic fibromas, and therefore the high prevalence of HPV in our group without cancer must be a regional characteristic. Brazilian (44, 46) and Italian (14) studies of OSCC have reported a higher prevalence of HPV18 than HPV16, which agrees with our results, but does not agree with the majority of studies conducted in other countries where HPV 16 is the most prevalent type in oral malignant lesions (16, 41, 45). Only the OSCC^{WT} and OSCC^W groups presented co-infection with both viral types, representing 10% of our malignant oral lesions, which is consistent with data reported by other authors (41, 44, 47).

Studies about mutations in the BUBR1 gene, its expression by mRNA, IHC and Northern blot have been performed in other types of samples such as adrenocortical tumors (48), breast cancer (25), lung cancer (49), thyroid tumors (50), glioblastomas (51), and hepatocellular carcinoma (52). Our findings of high BUBR1 expression in OSCC, from 70% to 78% of cases intergroup, were similar to the results reported by Grabsch *et al.* (26) that showed BUBR1 mRNA overexpression in 68% out of 43 gastric carcinomas, although without a correlation with DNA ploidy or histopathological parameters. We observed no significant association of BUBR1 expression and clinicopathologic features, except for location. On the other hand, Yamamoto *et al.* (23) and Burum-Auensen *et al.* (53) observed BUBR1 overexpression in bladder cancer and ulcerative colitis-associated colorectal cancer which was correlated with higher histological grade, advanced pathological stage, tumor recurrence and disease progression.

It has long been known that several virus-encoded proteins, including HPV E6/E7, induce aneuploidy and genomic instability by disrupting mitotic checkpoint controls. Some reported targets of these viral proteins are BUB1, BUBR1, MAD1 and MAD2 (22, 54-56). To our knowledge, there have been no studies evaluating BUBR1 expression in OSCC associated with HPV infection by IHC. In our study, HPV was more prevalent in the samples of oral carcinomas with high BUBR1 expression and in some cases that presented koilocytes, the expression of BUBR1 was observed only in the cytoplasm of these cells. This co-localization of HPV and BUBR1 immunolabeling may suggest some kind of interaction between the virus and BUBR1 protein. However, further studies analyzing this possibility in more detail could contribute to the understanding of the probable roles of HPV in carcinogenesis and in genomic instability.

Our malignant samples with high BUBR1 expression showed significantly shorter survival. Yamamoto *et al.* (23) analyzed BUBR1 by IHC in 104 human urothelial bladder carcinomas and

found similar results. The presence of HPV in our malignant samples was associated with shorter cumulative survival, which is not consistent with Chien *et al.* (57) and Armas *et al.* (58), who reported higher survival rates in HPV-positive patients with tonsil and head and neck carcinomas, respectively. The cause of this disagreement could be the fact that we found a higher prevalence of HPV in malignant cases than reported in other studies, or the variability of the sites evaluated in each study. In addition, the survival curves for HPV-positive Brazilian mouth floor carcinomas reported by Simonato *et al.* (39) were similar to ours.

It is known that BUBR1 interacts with and phosphorylates p53 (59), which is degraded by the HPV E6 oncoprotein (60, 61). Thus, BUBR1 overexpression in our samples of oral carcinomas could be a kind of compensatory response due to the probable competition binding of HPV oncoproteins to proteins at the mitotic checkpoint. According to our findings, the presence of HPV in oral mucosa with malignant lesions could induce deregulation of the expression of BUBR1, which is a key protein of the mitotic checkpoint. In addition, the overexpression of BUBR1 and the presence of HPV DNA, especially the high-risk type 18, were associated with shorter survival of patients with oral carcinoma. Since the relation between viruses and BUBR1 is a recent issue, our study brings new insights in the understanding of the role of HPV in oral carcinogenesis.

Acknowledgements

The present study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [National Council of Scientific and Technological Development], CNPq, a Brazilian research funding organization. We thank Ana Maria da Rocha for excellent technical assistance and Dr. Celso T Mendes-Junior for contributions to the statistical analyses.

References

1. Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, Bertolusso G and Gandolfo S: Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 1570-1579, 2008.
2. Scully C and Bagan J: Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral diseases*: doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x, 2009.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P and Parkin DM: GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press, Lyon; 2004.
4. INCA - Instituto Nacional de Câncer: Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: p. 94, 2007.
5. Goldenberg D, Brooksby C and Hollenbeak CS: Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral oncology* 45: e57-e61, 2009.
6. Massano J, Regateiro FS, Januario G and Ferreira A: Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 102: 67-76, 2006.
7. Andrews E, Seaman WT and Webster-Cyriaque J: Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral oncology* 45: 486-491, 2009.
8. Llamas-Martinez S, Esparza-Gomez G, Campo-Trapero J, Cancela-Rodriguez P, Bascones-Martinez A, Moreno-Lopez LA, Garcia-Nunez JA and Cerero-Lapiedra R: Genotypic determination by PCR-RFLP of

- human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). *Anticancer research* 28: 3733-3741, 2008.
9. Wunsch-Filho V: The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral oncology* 38: 737-746, 2002.
10. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L and Campisi G: HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 19: 1681-1690, 2008.
11. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N and Franceschi S: Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 1772-1783, 2003.
12. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE and Modesti NM: Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 35: 338-344, 2006.
13. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS and Kittas C: "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 13: 644-653, 2000.
14. Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V and Ammatuna P: Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *The Journal of infectious diseases* 185: 833-836, 2002.
15. Luo CW, Roan CH and Liu CJ: Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 36: 153-158, 2007.
16. Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M and Ishikawa T: Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 95: 594-600, 2003.
17. Lavia P, Mileo AM, Giordano A and Paggi MG: Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene* 22: 6508-6516, 2003.
18. Reshmi SC, Saunders WS, Kudla DM, Ragin CR and Gollin SM: Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* 41: 38-46, 2004.
19. Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I and Gollin SM: Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 303-308, 2000.
20. Reing JE, Gollin SM and Saunders WS: The occurrence of chromosome segregational defects is an intrinsic and heritable property of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer genetics and cytogenetics* 150: 57-61, 2004.
21. Rao CV, Yamada HY, Yao Y and Dai W: Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice. *Carcinogenesis*: doi: 10.1093/carcin/bgp081, 2009.
22. Kim S, Park SY, Yong H, Famulski JK, Chae S, Lee JH, Kang CM, Saya H, Chan GK and Cho H: HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* 27: 3457-3464, 2008.
23. Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, Furuya T, Oga A, Naito K and Sasaki K: Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer genetics and cytogenetics* 174: 42-47, 2007.
24. Shigeishi H, Yoneda S, Taki M, Nobumori T, Ohta K, Higashikawa K, Yasui W and Kamata N: Correlation of human Bub1 expression with tumor-proliferating activity in salivary gland tumors. *Oncology reports* 15: 933-938, 2006.
25. Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, Wersto RP, Tully E, Wilsbach K and Gabrielson E: Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res* 12: 405-410, 2006.
26. Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE and Mueller W: Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *The Journal of pathology* 200: 16-22, 2003.
27. Ying B and Wold WS: Adenovirus ADP protein (E3-11.6K), which is required for efficient cell lysis and virus release, interacts with human MAD2B. *Virology* 313: 224-234, 2003.

28. Burum-Auensen E, De Angelis PM, Schjolberg AR, Kravik KL, Aure M and Clausen OP: Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 55: 477-486, 2007.
29. Bettini JS, Soares EG, Duarte G, Simoes RT and Simoes AL: PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytol* 47: 545-549, 2003.
30. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ and Snijders PJ: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *The Journal of general virology* 76 (Pt 4): 1057-1062, 1995.
31. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science New York, NY* 230: 1350-1354, 1985.
32. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189: 12-19, 1999.
33. Sanguinetti CJ, Dias Neto E and Simpson AJ: Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 914-921, 1994.
34. Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR and Myoung H: Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral oncology* 42: 208-217, 2006.
35. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP and Shah JP: Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head & neck* 26: 31-38, 2004.
36. Ghoshal S, Mallick I, Panda N and Sharma SC: Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. *Oral oncology* 42: 533-539, 2006.
37. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C and Marton IJ: Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res* 14: 85-92, 2008.
38. Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R and La Vecchia C: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral oncology* 40: 207-213, 2004.
39. Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA and Miyahara GI: Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med* 37: 593-598, 2008.
40. Nair S and Pillai MR: Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral diseases* 11: 350-359, 2005.
41. Zhang ZY, Sdek P, Cao J and Chen WT: Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 33: 71-74, 2004.
42. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K and Barten M: Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Medical microbiology and immunology* 192: 145-148, 2003.
43. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, Turek LP and Haugen TH: Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *International journal of cancer* 104: 336-344, 2003.
44. Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Souza LB, Medeiros SR and Costa Ade L: High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Auris, nasus, larynx* 36: 450-456, 2009.
45. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R and Garcia-Carranca A: High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Archives of medical research* 39: 189-197, 2008.
46. Soares RC, Oliveira MC, de Souza LB, Costa Ade L and Pinto LP: Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients. *J Appl Oral Sci* 16: 340-344, 2008.
47. Nagpal JK, Patnaik S and Das BR: Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *International journal of cancer* 97: 649-653, 2002.
48. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E and Bertherat J: Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 27: 1108-1115, 2009.

49. Haruki N, Saito H, Harano T, Nomoto S, Takahashi T, Osada H, Fujii Y and Takahashi T: Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer letters* 162: 201-205, 2001.
50. Ouyang B, Knauf JA, Ain K, Nacev B and Fagin JA: Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1. *Clinical endocrinology* 56: 341-350, 2002.
51. Reis RM, Nakamura M, Masuoka J, Watanabe T, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H: Mutation analysis of hBUB1, hBUBR1 and hBUB3 genes in glioblastomas. *Acta neuropathologica* 101: 297-304, 2001.
52. Saeki A, Tamura S, Ito N, Kiso S, Matsuda Y, Yabuuchi I, Kawata S and Matsuzawa Y: Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 94: 2047-2054, 2002.
53. Burum-Auensen E, Deangelis PM, Schjolberg AR, Roislien J, Andersen SN and Clausen OP: Spindle proteins Aurora A and BUB1B, but not Mad2, are aberrantly expressed in dysplastic mucosa of patients with longstanding ulcerative colitis. *Journal of clinical pathology* 60: 1403-1408, 2007.
54. Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, Perera D, Freire R, Entwistle A, Golemis EA, Roberts TM, Jat PS and Gjoerup OV: Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 947-952, 2004.
55. Jin DY, Spencer F and Jeang KT: Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* 93: 81-91, 1998.
56. Pan SH, Tai CC, Lin CS, Hsu WB, Chou SF, Lai CC, Chen JY, Tien HF, Lee FY and Wang WB: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. *Carcinogenesis* 30: 366-375, 2009.
57. Chien CY, Su CY, Fang FM, Huang HY, Chuang HC, Chen CM and Huang CC: Lower prevalence but favorable survival for human papillomavirus-related squamous cell carcinoma of tonsil in Taiwan. *Oral oncology* 44: 174-179, 2008.
58. Armas GL, Su CY, Huang CC, Fang FM, Chen CM and Chien CY: The impact of virus in N3 node dissection for head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265: 1379-1384, 2008.
59. Ha GH, Baek KH, Kim HS, Jeong SJ, Kim CM, McKeon F and Lee CW: p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer research* 67: 7155-7164, 2007.
60. Mammas IN, Sourvinos G, Giannoudis A and Spandidos DA: Human papilloma virus (HPV) and host cellular interactions. *Pathol Oncol Res* 14: 345-354, 2008.
61. Narisawa-Saito M and Kiyono T: Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science* 98: 1505-1511, 2007.

TABLES

Table I - Clinical parameters of the 86 patients evaluated according to age, sex and tobacco and alcohol exposure.

Variable	OL ^{NM} n = 16	OSCC ^{IS} n = 20	OSCC ^{WT} n = 27	OSCC ^W n = 23	TOTAL N = 86
Age M ± SD	52.94 ± 14.55	54.45 ± 11.51	59.41 ± 12.76	58.43 ± 13.25	56.79 ± 13.01
Gender n(%)					
Male	10 (62.5%)	18 (90.0%)	21 (77.8%)	22 (95.6%)	71 (82.6%)
Female	6 (37.5%)	2 (10.0%)	6 (22.2%)	1 (4.4%)	15 (17.4%)
Tabacco exposure n(%)					
Yes	6 (37.5%)	20 (100%)	21 (77.8%)	22 (95.6%)	69 (80.2%)*
No	6 (37.5%)	0 (0%)	6 (22.2%)	1 (4.4%)	13 (15.1%)*
Alcohol exposure n(%)					
Yes	3 (18.8%)	14 (70.0%)	19 (70.4%)	21 (91.3%)	57 (66.3%)*
No	8 (50.0%)	6 (30.0%)	8 (29.6%)	2 (8.7%)	24 (27.9%)*

OL^{NM} = Non-malignant Oral Lesion; OSCC^{IS} = In situ oral squamous cell carcinoma; OSCC^{WT} = Invasive oral squamous cell carcinoma without metastases; OSCC^W = Invasive oral squamous cell carcinoma with metastases
 (*) No information was available about tobacco and alcohol exposure for four and five patients, respectively.
 M = Mean; SD = Standard Deviation.

Table II - Clinical parameters of malignant *versus* non-malignant groups and among the different groups of oral squamous cell carcinoma.

Variable	Age ^a	Gender ^b	Tobacco exposure ^b	Alcohol exposure ^b
OSCC ^{IS} vs. OL ^{NM}	p = 0.7368	p = 0.1034 OR = 5.400 CI (0.9128-31.947)	p = 0.0010 OR = 41.000 CI (2.022-831.32)	p = 0.0309 OR = 6.222 CI (1.212-31.950)
OSCC ^{WT} vs. OL ^{NM}	p = 0.1517	p = 0.3126 OR = 2.100 CI (0.5392-8.179)	p = 0.1331 OR = 3.500 CI (0.8204-14.932)	p = 0.0309 OR = 6.222 CI (1.212-31.950)
OSCC ^W vs. OL ^{NM}	p = 0.2382	p = 0.0127 OR = 13.200 CI (1.397-124.69)	p = 0.0033 OR = 22.000 CI (2.201-219.87)	p = 0.0003 OR = 28.000 CI (3.919-200.03)
Malignant vs. OL ^{NM}	p = 0.2432	p = 0.0296 OR = 4.067 CI (1.188 to 13.925)	p = 0.0027 OR = 9.000 CI (2.275-35.603)	p = 0.0020 OR = 9.000 CI (2.133 to 37.977)
OSCC ^{WT} vs. OSCC ^{IS}	p = 0.1706	p = 0.4369 OR = 0.3889 CI (0.06963-2.172)	p = 0.0312 OR = 0.08068 CI (0.0043-1.526)	p = 1.0000 OR = 1.018 CI (0.2876-3.603)
OSCC ^W vs. OSCC ^{WT}	p = 0.7936	p = 0.1068 OR = 6.286 CI (0.6962-56.750)	p = 0.1068 OR = 6.286 CI (0.6962-56.750)	p = 0.0850 OR = 4.421 CI (0.8326-23.475)

OL^{NM} = Non-malignant Oral Lesion; OSCC^{IS} = In situ oral squamous cell carcinoma; OSCC^{WT} = Invasive oral squamous cell carcinoma without metastases; OSCC^W = Invasive oral squamous cell carcinoma with metastases.
 p = *p-value*; OR = Odds Ratio; CI = 95% Confidence Interval. ^aUnpaired t test; ^bFisher's exact test.

Table III – Correlation of qualitative BUBR1 expression with clinicopathologic features in all OSCC samples.

	Malignant groups (n = 70)		<i>p value</i> ± <i>S.E.</i>
	Low Expression	High Expression	
Location			
Tongue	5	28	^ap = 0.0078 ± 0.0003
Lips	3	9	
Mouth floor	2	6	
Gum	5	1	
Buccal mucosa	0	5	
Retromolar area	3	3	
TNM stage			
Tis	2	7	^ap = 0.7944 ± 0.0008
T1-T2	12	29	
T3-T4	4	16	
Nx	7	15	^ap = 0.7793 ± 0.0009
N0	4	14	
N1-N3	7	23	
Mx	17	50	^bp = 1.000
M0	1	2	
Tumor treatment			
Surgery	6	15	^ap = 0.9704 ± 0.0002
Surgery plus	8	25	
RTx and/or QTx	3	10	
RTx and/or QTx	3	10	
Other treatments*	1	2	

Recurrence

Yes	8	22	^b p = 1.000
No	10	30	
Death			
Yes	3	22	^b p = 0.0850
No	15	30	
Total (n)	18	52	

OL^{NM} = Non-malignant Oral Lesion; OSCC^{IS} = In situ oral squamous cell carcinoma; OSCC^{WT} = Invasive oral squamous cell carcinoma without metastases; OSCC^W = Invasive oral squamous cell carcinoma with metastases. LE: Low Expression; HE: High Expression; SE = Standard Error.

(*) Other treatments: phototherapy or treatment at another service.

^a RXC software (<http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>); ^bFisher's Exact Test

Table IV – Immunoexpression of BUBR1 in malignant versus non-malignant oral lesions.

Histological groups	<i>p</i> value
OSCC ^{IS} vs. OL ^{NM}	^a p < 0.001 *
OSCC ^{WT} vs. OL ^{NM}	^a p < 0.001 *
OSCC ^W vs. OL ^{NM}	^a p < 0.001 *
OSCC ^{WT} vs. OSCC ^{IS}	^a p > 0.05
OSCC ^W vs. OSCC ^{IS}	^a p > 0.05
OSCC ^W vs. OSCC ^{WT}	^a p > 0.05
MALIGNANT vs. OL^{NM}	^b p < 0.001 *

OL^{NM} = Non-malignant oral lesion; OSCC^{IS} = In Situ Oral Squamous Cell Carcinoma; OSCC^{IS} = In situ oral squamous cell carcinoma; OSCC^{WT} = Invasive oral squamous cell carcinoma without metastases; OSCC^W = Invasive oral squamous cell carcinoma with metastases. (*) Statistically significant.

^aOne-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer post-test (*p* < 0.0001).

^bUnpaired t test with Welch correction (*p* < 0.0001).

Table V – BUBR1 expression in malignant oral lesions according to prevalence of HPV and types.

BUBR1 expression	HPV + n = 63	HPV - n = 7	HPV 16 n = 9	HPV 18 n = 17	HPV 16/18 n = 7
High	48 (76.2%)	4 (57.1%)	5 (55.6%)	13 (76.5%)	4 (57.1%)
Low	15 (23.8%)	3 (42.9%)	4 (44.4%)	4 (23.5%)	3 (42.9%)
<i>p</i> -value	p = 0.3626		p = 0.1983		p = 0.3423

Fisher's Exact Test

Table VI – BUBR1 expression in HPV-positive cases.

HPV + Cases	High expression	Low expression	<i>p</i> -value
	Mean ± SD	Mean ± SD	
OSCC ^{IS} (n = 15)	70.3 ± 2.874	62.9 ± 2.276	^a p = 0.2945
OSCC ^{WT} (n = 25)	72.1 ± 1.876	64.2 ± 3.166	^b p = 0.0558
OSCC ^W (n = 23)	68.9 ± 2.392	54.3 ± 4.463	^b p = 0.0278*
Malignant (n = 63)	70.5 ± 1.333	60.6 ± 2.343	^b p = 0.0014*

LN (n = 23)	69.6 ± 1.565	56.5 ± 2.570	^b <i>p</i> = 0.0010*
OSCC ^{IS} = In situ oral squamous cell carcinoma; OSCC ^{WT} = Invasive oral squamous cell carcinoma without metastases; OSCC ^W = Invasive oral squamous cell carcinoma with metastases; LN = Lymph nodes. SD = Standard Deviation; (*) Statistically significant. ^a Mann-Whitney Test; ^b Unpaired t test with Welch correction.			

FIGURES

Figure 1. BUBR1 expression determined by immunohistochemistry. (A) BUBR1 expression in cells of germinal centers (arrows) of a normal tonsil used as positive control; (B) Absence of expression in a normal tonsil without the step of primary antibody incubation (negative control); (C) Non-malignant oral lesion negative for BUBR1, but with koilocytes expressing the protein (arrow); (D) High expression of BUBR1 in oral carcinoma *in situ*; (E) Invasive carcinoma with metastasis with high expression; (F)

Metastatic lymph node with high expression of BUBR1 in malignant cells and diffuse immunolabeling in the surrounding lymphocytes.

Figure 2. Quantitative BUBR1 expression according to histological group.

Figure 3. Cumulative survival of 70 oral malignant lesions with distinct profiles of BUBR1 expression. The difference between the curves was significant ($p = 0.0479$).