ANGELO RAFAEL CALABRIA TANCREDI

**ESTUDO CLÍNICO, EPIDEMIOLÓGICO, HISTOLÓGICO DE
PAPILOMAS DA MUCOSA ORAL E SUA RELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E PCR**

São Paulo

2007

Angelo Rafael Calabria Tancredi

Estudo clínico, epidemiológico, histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Marcucci

São Paulo

2007

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Tancredi, Angelo Rafael Calabria

Estudo clínico, epidemiológico, histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com Papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR - São Paulo, 2007.

61: fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Papiloma bucal - 2. Papilomavírus humano - 3. Diagnóstico bucal

CDD 617.63
BLACK D62

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tancredi ARC. Estudos clínicos, epidemiológicos e histológicos de papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia USP; 2007.

São Paulo, / / 2007

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus por permitir ter Maria Lúcia e Raffaele, meus pais, que sempre tiveram a compreensão e sempre me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos e decisões da minha vida. Minha eterna gratidão pelo exemplo de caráter e vida que puderam me proporcionar. Amo vocês!

À minha irmã Patrícia, pela compreensão, amizade, carinho e pelos constantes estímulos não permitindo que desanimasse jamais! Te amo irmã querida !

À minha tia Lila, agradeço a Deus por tê-la em meu caminho e na minha vida.

À minha noiva Krishna, mulher da minha vida, agradeço a amizade, o companheirismo, a cumplicidade, a paciência, o amor e o incentivo que desde sempre me proporcionou. Presente de Deus! Te amo sempre !

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Marcucci agradeço pela confiança depositada na minha pessoa e no meu trabalho. Obrigado Professor pelo aprendizado e pela oportunidade em ser seu orientado, isso carregarei comigo eternamente.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes pela oportunidade de ter sua colaboração direta e indiscutível para que fosse realizada essa pesquisa.

Aos meus primeiros Professores de Semiologia, André e Dulce, minha enorme gratidão pelos primeiros ensinamentos e por toda a orientação no início da minha caminhada. Tudo isso é fruto do estímulo de vocês!

Ao Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr agradeço pela amizade e pelos ensinamentos que foram consolidados por ti. Muito Obrigado!

Aos Professores da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade, convivência e por nos ensinar de forma competente.

Aos Profs. Drs. e colegas Carlos Eduardo Ribeiro e Francisco Octávio Pacca pelo apoio, pelas sugestões e pelo carinho. Muito Obrigado!

A todos os colegas de Pós Graduação em Diagnóstico Bucal da FOU SP, pelo companheirismo e pela convivência que pudemos partilhar ao longo dessa jornada.

Agradecimento especial a Daniela Xavier Nunes e aos novos colegas da Patologia Bucal, Renata Acay, Patrícia Adachi, Paulo Braz, Roberto Chico, Hélder Antônio, Fábio Couracin, Tatiana Libório e Camila Rodini, com vocês este trabalho fica engrandecido.

À Nina, Cida (CIDOCA), Cecília, Bia, Patrícia e Elisa por sempre se disponibilizarem para que esse trabalho fosse desenvolvido. Muito Grato com todo meu carinho por vocês.

A CAPES pela bolsa de Mestrado no programa Demanda Social

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai a sua influência.

(Henry B. Adams)

A esperança adquire-se. Chega-se à esperança através da verdade, pagando o preço de repetidos esforços e de uma longa paciência. Para encontrar a esperança é necessário ir além do desespero. Quando chegamos ao fim da noite, encontramos a aurora.

(Georges Bernanos)

A felicidade não está no fim da jornada, mas sim em cada curva do caminho que percorremos para a encontrar.

(Autor desconhecido)

Tancredi, ARC. Estudos clínicos, epidemiológicos e histológicos de papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia USP; 2007.

RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é um DNA vírus do grupo papovavírus, que é altamente transmissível sexualmente, sendo bastante encontrado na região anogenital e mucosa oral. A sua implantação oral pode ser por auto-inoculação ou pelo contato oro-sexual. As principais manifestações orais associadas ao HPV são: papiloma, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal. O papiloma é uma lesão epitelial associada ao HPV e pode ocorrer em vários locais da mucosa oral. Histopatologicamente, o papiloma oral é caracterizado por coilocitose, disqueratose, papilomatose, hiperqueratose e acantose. A literatura ressalta a importância do estudo dessas lesões, uma vez que estudos demonstram que mesmo com os achados macroscópicos e histológicos serem compatíveis com a presença do vírus, somente técnicas de detecção podem comprovar a presença viral. O objetivo deste estudo foi verificar a presença do HPV, por meio das técnicas de hibridização *in situ* e PCR, em lesões diagnosticadas histopatologicamente como papilomas e comparar esses resultados com características clínicas e histológicas. Cinquenta casos foram selecionados da Disciplina de Patologia Bucal e da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP. Esta seleção de 50 casos foi submetida à reação de hibridização *in situ*, e 10 casos dentre os mesmos por técnica da PCR e 100% casos foram negativos. Nenhuma das características histológicas previamente analisadas puderam formar estreita relação com a hibridização *in situ* e PCR. Conclui-se que a análise histopatológica ao HE não se correlaciona com os resultados das técnicas de hibridização *in situ* e PCR, porém importante ressaltar para detecção do HPV nas lesões estudadas é imprescindível o uso de técnicas de Biologia Molecular otimizadas como a hibridização *in situ* e PCR realizadas nesse estudo.

Palavras-chave: Papiloma oral – papilomavírus humano (HPV) – hibridização *in situ* – PCR - diagnóstico histopatológico – diagnóstico molecular

Tancredi, ARC. Clinic, epidemiologic, histologic study of oral papillomas and its relation to Humanpapillomavirus (HPV) by *In Situ* Hybridization and PCR [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculty of Dentistry USP; 2007.

ABSTRACT

The Humanpapillomavirus (HPV) is a DNA virus from the group of papovavirus, which is highly sexually transmitted and it can be often found in the anogenital area and in the oral mucosal. The oral implantation can be by self-inoculation or by the oral sexual contact. The main oral appearances associated to HPV are: papilloma, condylomata acuminata, verruca vulgaris and focal epithelial hyperplasia. Papilloma is an epithelial lesion that is associated to HPV and can occurs in many places of the oral mucosal. Histopathologically, the oral papilloma is characterized by koylocitosis, dyskeratosis, papillomatosis, hyperkeratosis and acanthosis. The literature shows the importance of these lesions once studies show that macroscopic and histologic finds suggest the presence of the virus, only detection technics can prove the viral presence. The target of this study is to check the presence of HPV, by means of *In situ* hybridization and PCR, in lesions diagnosed histopathologically as papillomas and compare these results with clinic and histologic features. Fifty cases were selected from the Discipline of Oral Pathology and the Discipline of Oral Diagnose of FOU SP. This selection of 50 cases were submitted to the reaction of *In situ* hybridization, and 10 cases among the same by PCR and 100% of the cases were negative. None of the histologic features were previously analyzed could form a narrow relation with the *In situ* hybridization and PCR. Therefore it is concluded that the histopathologic analysis to HE do not correlate with the results of the *In situ* hybridization and PCR, however the detection of the HPV in the studied lesions it is absolutely necessary the use of Molecular Biology techniques as the *In situ* hybridization and PCR done in this study.

Key Words: Oral papilloma – Humanpapillomavirus (HPV) – *In situ* hybridization – PCR - histopathologic diagnose – molecular diagnose

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Mapa Genômico do HPV tipo 16	18
Figura 4.1 - Gel de Agarose 2% mostrando amplificação PCR da lesão	37
Figura 5.1 – Aspectos clínicos e localização mais freqüente	38
Figura 5.2 - Aspectos clínicos e localização mais freqüente	38
Figura 5.3 - Aspectos clínicos e localização mais freqüente	38
Figura 5.4 - Características histopatológicas do papiloma	39
Figura 5.5 - Gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação por PCR do DNA da lesão mostrando da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular (LM), o controle positivo (C+) com bandas iluminadas para 200pb e 400pb, as 10 amostras e o controle negativo (C-).....	43
Figura 5.6 - Imagem da PCR mostrando negatividade em todos os casos (1-10). Observar os marcadores de peso molecular (LM) na primeira coluna, os dois controles positivos C+, na segunda e terceira coluna, e o controle negativo na última coluna.....	43

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Quadro 4.1 - Dados referentes aos iniciadores GP5-GP6.....	35
Quadro 4.2 - Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR.....	35
Gráfico 5.4 -Características Histopatológicas.....	39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

HPV	Papilomavírus humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da polimerase em cadeia)
HE	Hematoxilina e Eosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
NaCl	Cloreto de sódio
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
ISH	<i>In Situ Hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i>)
CSA-ISH	<i>In Situ Hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i> com sinal amplificado)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
W	Watts
μm	Micrômetro
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromol
dNTP	Deoxinucleotídeotrifosfato
nt	Nucleotídeo
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto
OD	Densidade óptica
pmol	Picomol
pb	Pares de base

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Papilomavírus humano (HPV)	16
2.2 Papiloma oral – características clínicas, epidemiológicas e histológicas...	20
2.3 Testes diagnósticos para detecção do HPV	23
3 PROPOSIÇÃO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Casuística e análise morfológica.....	33
4.2 Técnica de Hibridização <i>in situ</i>	30
4.3 Características Histopatológicas	32
4.4 Análise e critérios adotados para interpretação dos resultados da ISH.....	33
4.5 Reação da PCR para HPV.....	33
4.6 Análise e critérios adotados para resultado da técnica da PCR.....	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Dados Clínicos.....	38
5.2 Características histopatológicas	39
5.3 Positividade para sonda HPV amplo espectro para CSA-ISH.....	42
5.4 Amplificação para sonda HPV amplo espectro na PCR.....	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus pertencente à família dos papovavírus de tamanho reduzido e DNA circular, de fita dupla, epiteliotrópico, não envelopado, com cerca de 8000 pares de bases e com estrutura física e organização gênica bem conhecida. Seu genoma é composto de genes precoces (E), cuja função primária é a replicação episomal e genes tardios (L), que codificam as proteínas do capsídeo viral. Os genes precoces (E) são divididos em E1 a E7 e os tardios em L1/L2 (BODINI; FIAMMINGHI, 1989; KUROSE; TERAÍ; SOEDARSONO, 2003; LOPES; MEEKS, 2001; SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; TERAÍ; TAKAGI, 2001). O HPV está envolvido na patogênese de papilomas orais, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal (BISHOP; EMANUEL; SIMS, 1998; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; CHANG et al., 1991; COSTA et al., 1994; DHARIWAL; CUBIE; SOUTHAM, 1995; PIGNATARI; WECKX; BORDASCH, 1995; SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; SOARES et al., 2005; SYRJANEN, 2003).

As células basais do epitélio são o alvo da infecção pelo vírus onde este atinge seus núcleos através de microlacerações no epitélio causando lesões que são acompanhadas de uma hiperplasia do epitélio, característica comum de lesões induzidas por HPV (CHANG et al., 1991).

O papiloma oral é uma lesão benigna da mucosa oral que acomete principalmente a língua e palato, sem predileção por sexo. Inicialmente era descrito como um neoplasma benigno intraepitelial, porém alguns têm demonstrado sua etiologia viral, fato esse relevante devido à grande variedade, complexidade e fácil

transmissão desse vírus, inclusive por auto inoculação (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; SOARES et al, 2005).

Clinicamente, o papiloma oral apresenta-se como um crescimento exofítico, peduncular, indolor, cuja superfície mostra projeções digitiformes ou verrucosas, mais comumente encontrado em língua e palato. O diagnóstico diferencial se faz com verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal e condiloma acuminado. Apresenta quadro histopatológico caracterizado por crescimento peduncular exofítico com tecido conjuntivo fibroso recoberto com projeções epiteliais papilares e freqüentemente hiperqueratose, coilocitose, disqueratose, papilomatose e acantose (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; CHANG et al., 1991; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; SYRJANEN, 2003; YAMAGUCHI et al. 1998).

O diagnóstico de infecção pelo HPV é frequentemente baseado em uma combinação de aparências clínicas e histopatológicos dos tecidos que foram submetidos à biópsia (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985). Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica de hibridização *in situ* são técnicas frequentemente utilizadas quando se procura estabelecer qual subtipo viral está presente no tecido biopsiado. Como o HPV-6 e o HPV-11 são classificados como baixo risco ou não oncogênicos, e os HPV-16 e HPV-18 são classificados como de alto risco ou oncogênicos, é muito importante o uso de técnicas sensíveis e eficientes para definir o subtipo viral (TERAI; TAKAGI, 2001).

Apesar dos diversos aspectos citados que justifiquem o envolvimento do HPV na iniciação e progressão de várias lesões orais alguns fatores não estão suficientemente esclarecidos. Dentre estes fatores podemos destacar o achado freqüente de vários tipos de HPV em mucosa normal, com incidência variando de 0% a 81% incluindo os HPV de alto e baixo risco. Acredita-se que esta presença

pode estar associada a infecções sub-clínicas ou latentes ou a um quadro infeccioso com um baixo número de cópias do vírus ou ainda, que a cavidade oral funcione como um reservatório de HPV (TERAI; TAKAGI, 2001).

Outros fatores a serem considerados que limitam a comprovação do papel do HPV no desenvolvimento de lesões orais são: a variação da sensibilidade dos métodos de detecção empregados, a divergência de tipos de material pesquisado, bem como à diversidade das populações estudadas e as dimensões das lesões (ELAMIN et al., 1998). Por este motivo, o emprego de métodos de alta sensibilidade e a padronização de amostras representativas constitui condição fundamental para a realização de estudos de alta confiabilidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus humano (HPV)

O Papilomavírus humano (HPV) é um pequeno vírus de 55 nm de diâmetro com DNA circular de fita dupla, não envelopado, epiteliotrópico, com cerca de 8.000 pares de bases e com estrutura física e organização gênica bem conhecida (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; TERAÍ; TAKAGI, 2001). As partículas icosaédricas do papilomavírus contêm 72 capsômeros e são dependentes do meio de diferenciação terminal dos ceratinócitos para replicação, síntese do capsídeo e montagem do vírus (OLIVEIRA et al., 2005; SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985).

O genoma do HPV é composto de *early-phase genes* ou genes precoces (E), cuja função primária é a replicação epissomal, *late-phase genes* ou genes tardios (L), que codificam as proteínas do capsídeo viral e uma região longa de controle (LCR) que compreende apenas cerca de 10% do genoma viral. Os genes precoces (E) são divididos em E1 a E7 e os tardios em L1 e L2. Os genes E6 e E7 por sua vez são regulados pelos genes inibidores E1 e E2. A sequência entre o fim de L1 e o começo de E6 é a região longa de controle (LCR) e é conhecida também como região não codante (NCR). Essas regiões contêm muitas das sequências regulatórias *cis* que controlam a transcrição e a replicação (OLIVEIRA et al., 2006).

Os produtos dos genes E1 e E2 estão mais especificamente ligados à regulação da transcrição e replicação das proteínas virais. Quando há integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, esses genes podem ser alterados ou

deletados levando à transcrição descontrolada das proteínas, inclusive das oncoproteínas virais E6 e E7 (HA; CALIFANO, 2004). Essas oncoproteínas são capazes de interferir em importantes mecanismos de controle do ciclo celular, apoptose e manutenção da estabilidade cromossômica, o que pode explicar a patogênese das doenças associadas à infecção por HPV (WENTZENSEN; VINOKUROVA; VON KNEBEL-DOEBERITZ, 2004). Acredita-se que as células tumorais resultam da desregulação de duas grandes vias de controle do ciclo celular: a via do p53 e a via do pRB e é justamente nessas duas vias que as oncoproteínas produzidas pelo HPV têm sua ação (FREGONESI et al., 2003).

A oncoproteína E6 pode se ligar e interferir no funcionamento do produto do gene supressor de tumor p53. Essa inativação da proteína p53 é fator conhecido para o desenvolvimento de neoplasias malignas em diversos sítios do corpo humano, inclusive em carcinomas epidermóides orais – a inativação do gene p53 seja por mutação ou por infecção por HPVs de alto risco é extremamente freqüente em diversas linhagens celulares de carcinoma epidermóide oral (MIN et al., 1994). A progressão para a malignidade é acompanhada pela perda de um mecanismo regulatório intracelular de inspeção, o qual correlaciona-se com uma abundante expressão gênica viral (TERAI; TAKAGI, 2001).

Além disso, E6 produzidas por HPVs de alto risco podem ativar a enzima telomerase, que sabidamente é outro fator envolvido na carcinogênese (SCULLY, 2002).

A oncoproteína E7 pode se ligar e interferir no funcionamento do produto do gene supressor de tumor Rb1 (pRB) e proteínas relacionadas. A forma hipofosforilada de pRB forma um complexo com o fator de transcrição E2F e impede a progressão do ciclo celular de G1 para S. E7 é capaz de romper essa interação

gengiva e assoalho de boca (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; SOARES et al., 2005).

A infecção pelo HPV é iniciada quando uma partícula viral penetra em células basais e células indiferenciadas e em divisão do epitélio. Nas células basais e parabasais, o DNA viral replica em um baixo padrão e apenas genes precoces são transcritos, também em baixo padrão. Multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo, ocorre apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. O vírus multiplica-se exclusivamente no núcleo de células infectadas. No entanto, a manifestação patológica associada ao HPV é confinada aos sítios onde a infecção foi iniciada. Partículas virais com capsídeos completos estão, portanto, ausentes nas células basais, e a replicação produtiva do HPV está restrita às células nos estratos espinhoso e granuloso (OLIVEIRA et al., 2006).

Devido os avanços na biologia molecular e genética, mais de 130 tipos de HPV já foram identificados. Destes, 25 tipos foram associados com lesões bucais (HPVs-1,2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35,40, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73). O HPV pode ser classificado como de alto ou baixo risco, dependendo da associação do tipo viral e malignidade. OS HPV-6 e HPV-11 têm um baixo risco de associação com a malignidade e estão comumente relacionados à etiologia de lesões proliferativas orais, como o papiloma e o condiloma acuminado, enquanto, os HPV-16 e HPV-18 são os tipos mais prevalentes em lesões malignas orais e por isto são chamados de oncogênicos ou de alto risco (SYRJANEN, 2003).

Apesar dos diversos aspectos citados que justifiquem o envolvimento do HPV na iniciação e progressão dos carcinomas orais alguns fatores não permitem defini-lo com precisão como um fato carcinogênico independente. Dentre estes fatores

podemos destacar o achado freqüente de vários tipos de HPV em mucosa normal, com incidência variando de 0% a 81%, o que inclui os HPVs de alto e baixo risco. Acredita-se que esta presença pode estar associada a infecções sub-clínicas ou latentes ou a um quadro infeccioso com um baixo número de cópias do vírus ou ainda, que a cavidade oral funcione como um reservatório de HPV (TERAI; TAKAGI, 2001). Porém estudos recentes com casuística expressiva e método muito sensível mostraram prevalência na mucosa normal entre 1 e 2% (HA; CALIFANO, 2004).

A posição das células infectadas no epitélio também pode indicar a relação entre infecção e lesão. Segundo Campisi et al. (2006), DNA de HPV encontrado nas camadas basal e suprabasal do epitélio representam infecção latente. Nessa forma inativa, o HPV não expressa suas oncoproteínas virais e, portanto, não interfere no ciclo celular. Os autores reforçam que esse tipo de infecção é de importância limitada na análise da relação entre infecção por HPV e lesões em mucosa oral.

2.2 Papiloma Oral – características clínicas, histopatológicas e etiopatogenia

O papiloma foi relatado pela primeira vez por Shope e Hurst (1933) em coelhos e a partir desse estudo um número cada vez mais expressivo de lesões foi relacionado à ação e patogênese do HPV inclusive o papiloma, que primeiramente era descrito apenas como um neoplasma benigno intraepitelial (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; SOARES et al., 2005).

A condição é descrita como a lesão mais comum relacionada ao HPV e considerada como uma neoplasia benigna e geralmente apresenta-se como um

crescimento exofítico. O papiloma oral é o tumor benigno mais diagnosticado (1-4.6%) e mais freqüentemente encontrado na língua, palato e lábio inferior, podendo ocorrer em qualquer idade, porém mais prevalente entre a 3ª. e 5ª. décadas de vida e distribuído igualmente entre os sexos (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; COSTA et al., 1994; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; GREER; GOLDMAN, 1974; WARD et al., 1995; YAMAGUCHI et al., 1998).

Clinicamente, o papiloma oral apresenta-se como um crescimento exofítico, peduncular, indolor, menor que 10mm, cuja superfície mostra projeções digitiformes ou verrucosas, mais comumente encontrado em língua e palato. O tratamento é cirúrgico com pequena margem de segurança para evitar a ocorrência de recidivas. O diagnóstico diferencial se faz com verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal e condiloma acuminado (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; CHANG et al., 1991; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; LOPES; MEEKS, 2001; SYRJANEN, 2003; WARD et al., 1995; YAMAGUCHI et al., 1998).

O quadro histopatológico do papiloma oral é caracterizado por uma proliferação do epitélio escamoso estratificado queratinizado, múltiplas projeções papilomatosas com áreas centrais de tecido conjuntivo fibrovascular, estes podem apresentar componentes inflamatórios dependendo do trauma causado pela lesão. Freqüentemente encontra-se hiperqueratose, disqueratose, papilomatose, acantose e coilocitose (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; COSTA et al., 1994; CHANG et al., 1991; GREER; GOLDMAN, 1974; OSHIRO et al., 1996; SILVA; QUEIROZ, 2006; SOARES et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 1998).

Uma característica bastante marcante no quadro histopatológico do papiloma oral é a presença de coilócitos, que pode ser definido como a presença de células exibindo núcleos picnóticos, contornado por extensos halos claros com volume

geralmente semelhante ao citoplasmático, ocorrendo preferencialmente em células superficiais (CHANG et al., 1991; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; OLIVEIRA et al., 2005).

A presença do HPV em células epiteliais causa danos que podem ser visualizados em microscopia de luz. O termo coilócito, que significa célula vazia, foi introduzido por Koss e Durfee (1956) para descrever as células de tamanho aumentado, apresentando núcleo pequeno, irregular e hipercromático, circundado por um halo claro negativo para glicogênio, que eram observadas em algumas lesões cervicais. Hoje sabe-se que os coilócitos não são patognomônicos para infecção por HPV e que essas alterações celulares são resultantes da degeneração produzida pela infecção viral ativa. Associada com outras características histológicas como acantose, disqueratose e multinucleação de queratinócitos, a presença de coilócitos é usada como evidência e sugestão, em microscopia de luz, de infecção por HPV em lesões planas ou papilares (FORNATORA et al., 1996; ZIOL et al., 1998). Entretanto essas características histológicas são apenas sugestivas; para a confirmação da infecção pelo HPV é necessário que se realize algum teste que detecte a presença do vírus.

Foram adicionadas características histopatológicas como cariorrexis, alteração de cromatina, hipercromatismo nuclear e células bi ou multinucleadas para associar à lesão com a infecção por HPV, de acordo com um protocolo citomorfológico em lesões cérvico-uterinas, proposto por Yamamoto et al. (2004) que fizeram uso desse protocolo para aumentar a especificidade de testes que detectam a presença de infecção por HPV.

2.3 Testes diagnósticos para a detecção do Papilomavírus humano (HPV)

São vários os métodos de identificação dos genomas do HPV e seus transcritos nos tecidos humanos, que incluem imunoperoxidase, hibridizações, PCRs, captura híbrida, sequenciamento de DNA, dentre outros (MOLIJN et al., 2005).

Os métodos têm sensibilidade e especificidade variadas e por este motivo podem ser separados em três categorias (OLIVEIRA et al., 2005):

- Baixa sensibilidade: microscopia eletrônica, imunoistoquímica, imunofluorescência e hibridização *in situ*. Em virtude de apenas detectar o vírus quando estão presentes em mais de 10 cópias de DNA viral por célula.
- Moderada sensibilidade: Southern blot, dot blot e hibridizações blot reversas. Pois detectam o vírus quando 1 a 10 cópias do DNA viral estão presentes por célula.
- Alta sensibilidade: Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). Por ser capaz de detectar um genoma viral em até 100.000 células.

Apesar desta classificação ser adotada para estudos experimentais, torna-se extremamente importante, considerar o contexto em que o método é utilizado. Diversos são os fatores que influenciam na sensibilidade do teste diagnóstico e por isto alteram a classificação sugerida acima. Dentre estes podemos citar: a integridade do genoma, o tamanho do fragmento de DNA do vírus, o tipo de amostra disponível, se tecidos frescos ou fixados e emblocados em parafina, a quantidade de

cópias do genoma viral e o tamanho macroscópico do espécime obtido. Para a determinação da sensibilidade do método, devem estar asseguradas a qualidade e pureza das amostras (OLIVEIRA et al., 2005; TERAÍ; TAKAGI, 2001).

A hibridização *in situ* classificada por Oliveira et al. (2005) como um teste de baixa sensibilidade não pode ser aplicada a este estudo, que utilizou a reação de hibridização *in situ* com sinal amplificado (CSA-ISH) e os autores que a utilizam acreditam ser uma técnica equivalente em sensibilidade a PCR para detecção de DNA viral em tecidos (BRITO; VASSALLO; ALTEMANI, 2000).

A técnica de imunoistoquímica não tem valor diagnóstico na infecção por HPV apesar da sensibilidade e especificidade na identificação de diversos outros vírus, devido a existência de muitos genótipos de HPV e também porque o DNA viral é bem mais abundante do que proteínas virais na infecção ativa (NUOVO, 2006). PCR e ISH são os métodos mais amplamente utilizados: o primeiro por ser comprovadamente o mais sensível e o segundo por permitir a localização morfológica das células infectadas no tecido (HERRINGTON, 1998; HUBBARD, 2003). Na tentativa de solucionar suas limitações, mais recentemente dois novos métodos foram propostos, Nested PCR e amplificação de sinal para ISH, proporcionando localização morfológica na ISH e maior sensibilidade na PCR (DABIC et al., 2004; NUOVO, 2006). Não há um método seguro que determine a relação causal vírus-doença, embora a detecção do HPV seja fortemente sugestiva; a avaliação de outros fatores como carga viral, soropositividade, estado de integração vírus-hospedeiro e posição das células infectadas no epitélio podem contribuir no sentido de comprovação de infecção por HPV (HUBBARD, 2003; SCULLY, 2002).

Outros fatores a serem considerados que impedem a comprovação do papel do HPV no desenvolvimento de lesões orais são: a variação da sensibilidade dos métodos de detecção empregados, a divergência de tipos de material pesquisado, bem como à diversidade das populações estudadas e o tamanho da amostra (ELAMIN et al., 1998). Por estes motivos, o emprego de métodos de alta sensibilidade e a padronização de amostras representativas constitui condição fundamental para a realização de estudos de alta confiabilidade.

Existe ainda a possibilidade de se pesquisar a soropositividade para HPV, porque a ausência do DNA viral na mucosa não significa necessariamente que o indivíduo nunca tenha sido exposto ao vírus (HA; CALIFANO, 2004). De acordo com o estudo de Dahlstrom et al. (2003), o vírus pode ter estado naquela mucosa, eventualmente até causando alguma alteração genética, e depois ter desaparecido – a detecção dessa infecção passada só é possível então através da pesquisa de anticorpos contra HPV. Esses autores sugerem que essa avaliação sorológica possa ser até melhor que a simples detecção de DNA de HPV.

A literatura envolvida nos últimos 20 anos segundo Tinoco et al. (2004) demonstraram que os estudos realizados neste período revelaram a importância do HPV em lesões da cavidade oral e orofaringe. A maioria absoluta dos autores acreditam haver relação do HPV com estas lesões. Seja por um co-fator, ou apenas, um agente de proliferação celular; outros porém o confirmam como agente etiológico.

O HPV como agente etiológico do papiloma oral está comprovado da mesma forma que lesões papilares do trato genital e pele (condiloma acuminado e verruga vulgar), porém os casos que não se comprovam a detecção do vírus estão geralmente relacionados com a técnica utilizada e as características das amostras.

Os estudos utilizando a técnica de hibridização *in situ* em blocos de parafina demonstraram que foram obtidos 7 casos positivos (35%) para HPV 6 e 11 entre os 20 casos selecionados e dupla infecção por HPV 2 e 6 quando os ensaios foram submetidos a condições de alta estridência . Os 13 casos negativos podem não ter reagido com as sondas empregadas ou pelo fato do DNA viral se encontrar em um pequeno número de cópias, insuficiente para o nível de detecção do método utilizado neste estudo. Histologicamente 45% dos papilomas orais apresentaram células semelhantes a coilocitos na camada espinhosa, o que não interferiu expressivamente na detecção do vírus (EVERSOLE; LAIPIS, 1988).

Segundo as tendências de desenvolvimento de técnicas aplicadas em Patologia tem sido claro que apenas a microscopia óptica e procedimentos de coloração são insuficientes para suspeitar da etiologia de algumas lesões associadas ao HPV, por isso que estudos realizados por Syrjanen, Syrjanen e Lamberg (1986) utilizaram a técnica de hibridização *in situ*, com sondas de amplo espectro e sob condições elevadas de estridência, obteve em um total de 7 papilomas uma positividade de 4 casos (57%), evidenciando uma forte implicação do HPV como agente causador desses papilomas e enfatizando a técnica como poderosa ferramenta na detecção do HPV.

Young e Min (1991) analisaram 21 pacientes com diagnóstico de papiloma oral, os quais foram submetidos a técnica de hibridização *in situ* com sondas específicas e neste estudo 13 papilomas escamosos (62%) foram positivos para HPV 6 e 11. Os autores evidenciaram que não houve nenhuma correlação entre os casos positivos e os aspectos histológicos (sésil ou pediculado, coilocitose ou padrão de queratinização).

Estudos feitos por Zeuss, Miller e White (1991) utilizaram 30 casos de papilomas orais emblocados em parafina os quais foram submetidos a técnica de hibridização *in situ* com sondas para HPV 6 e 11. Dos 30 casos selecionados apenas 4 (13.3%) apresentaram positividade para HPV. Quanto à comparação histológica apenas 2 casos positivos apresentaram células semelhantes a coilócitos.

Jimenez et al. (2001) utilizaram o exame de PCR em blocos parafinados de biópsias com diagnóstico de papiloma oral e do total de 27 casos, 11 (40.74%) foram positivos para HPV. Os autores enfatizam que os casos negativos podem estar associados a diversos fatores: pequenas quantidades de DNA ou mesmo o fato da maioria das infecções orais causadas por HPV serem provavelmente infecções pouco produtivas ou até mesmo em estado latente.

O estudo realizado por Syrjanen et al. (1987) avaliaram uma série de 92 casos de papiloma/condiloma acuminado. O critério para incluir as duas lesões deve-se a similaridade histológica de ambas lesões. Realizada a técnica de hibridização *in situ* em amostras emblocadas em parafina obteve-se dos 92 casos, 45 casos positivos (48.9%) para as sondas específicas de HPV 6, 11 e 13.

Loning et al. (1985) realizaram um estudo com 5 papilomas orais, 5 leucoplasias e 6 carcinomas. Realizada a técnica de hibridização *in situ* nos 5 papilomas emblocados em parafina, os autores obtiveram 4 casos (80%) positivos com sondas de amplo espectro sem condições de estringência. Ressaltado pelos autores que um dos casos negativos não havia discrepância entre os resultados imunohistológicos x presença do vírus; avaliaram que isso se deve provavelmente pela perda do tecido infectado pelo vírus durante a secção do tecido a ser tratado.

Em estudo realizado por Dhariwal, Cubie e Southam (1995) avaliaram 3 kits para tipagem do HPV em 20 lesões (19 condiloma acuminado e 1 papiloma

escamoso). A técnica de hibridização *in situ* foi realizada a partir dos blocos de parafina e o Kit BIOHIT HPV *in situ* Typing Test (Croft Biotech, UK) possibilitou a positividade para HPV neste caso de papiloma por ser o que apresentou maior sensibilidade entre os kits utilizados.

A comparação entre PCR e ISH foi avaliada por Ward et al. (1995). Nesse estudo os autores utilizaram 19 casos com diagnóstico de papiloma oral e submeteram os mesmos a técnica da PCR. Os resultados evidenciaram a participação do HPV 6 e 11 em 13 casos (68%). Esses resultados contrariam estudos dos próprios autores quando utilizaram 30 casos (13.3%) submetidos a ISH para detecção do DNA do HPV, onde haviam aproximadamente 20 a 50 cópias virais por célula ou não havia seqüências de DNA ou até mesmo poucas cópias para serem detectadas por ISH.

A análise do HPV 16 e 18 em papilomas orais pela técnica de hibridização *in situ* foi avaliada por Lopes e Meeks (2001). Os autores utilizaram 5 pacientes HIV + que apresentaram diagnóstico histológico de papiloma e realizaram ISH nos casos emblocados em parafina com sondas específicas para HPV 16 e 18. Os pacientes apresentavam mais de uma lesão em cavidade oral e no total de 16 lesões, 9 (52.2%) apresentaram positividade para essas sondas específicas. Apesar dos papilomas estarem associados aos subtipos de baixo risco, este estudo demonstra a susceptibilidade à infecção pelo HPV, provavelmente devido a supressão do sistema imune comprometidos pelo HIV.

A prevalência do HPV em papilomas orais pode variar de 4% a 80% segundo Yamaguchi et al. (1998), dependendo dos métodos de detecção utilizados. Essa discrepância permite que fica a esclarecer qual é o melhor método de detecção do HPV e o tipo de amostra utilizada para obter resultados fiéis para detecção do HPV .

3 PROPOSIÇÃO

1) Identificar e quantificar alterações histológicas do papiloma oral compatíveis com a presença de vírus nas células do epitélio.

2) Relacionar as alterações clínicas, epidemiológicas e histológicas observadas em HE com a localização do DNA do HPV verificada por hibridização *in situ* e PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística e análise morfológica

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme parecer de aprovação número 150/05 (Anexos A,B e C).

Casos diagnosticados como papiloma foram selecionados dos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal e da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Cortes corados por HE referentes a esses casos foram submetidos a um estudo morfológico sob microscopia de luz para confirmação do diagnóstico. Dados referentes à idade, sexo, raça, bem como sítios da lesão foram observados.

4.2 Técnica de hibridização *in situ*

A partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, previamente fixado em formol 10% e emblocados em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e silanizadas. Após secagem durante 24 horas em estufa a 60°C, os cortes foram submetidos à desparafinização em dois banhos de xilol, um a

60°C por 15 minutos, e outro em temperatura ambiente por mais 15 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em série descendentes de etanóis, através de duas passagens de 1 minuto cada em etanol absoluto e uma passagem de 3 minutos em etanol 95%. Posteriormente, foram lavados em banho de água destilada durante 6 minutos.

Os cortes receberam tratamento com solução de recuperação antigênica concentrada (Dakocytomation, USA), diluída em água destilada na proporção volumétrica de 1:10, em microondas de 900W em quatro ciclos de 4 minutos cada, sendo o primeiro utilizando potência máxima e os outros três utilizando 20% da potência. Após resfriamento completo da solução em temperatura ambiente e lavagem em água destilada, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com dois banhos de 10 minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio a 9% e metanol, na proporção volumétrica de 1:1.

Os cortes foram então lavados novamente em água destilada, secos e encubados com a sonda biotinilada de amplo espectro para DNA de HPV. Os cortes foram cobertos com lamínulas de vidro, para permitir íntimo contato entre a sonda e o tecido, e as lâminas foram colocadas sobre uma placa com temperatura de 95°C durante 5 minutos, para desnaturação protéica do DNA da sonda e do DNA-alvo no tecido. As lâminas ficaram em câmara úmida por 21 horas à temperatura de 37°C para a hibridização.

No segundo dia, os cortes foram lavados com tampão TRIS-NaCl, pH 7,4 e a detecção da hibridização procedeu-se utilizando o sistema catalisado de amplificação de sinal para hibridização *in situ* (CSA-ISH) GenPoint™ (DakoCytomation, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Os passos seguintes foram a desidratação em cadeia ascendente de etanóis, com concentração inicial de 70% até chegar em 100%, através de banhos de 2 minutos em cada etanol, e a diafanização em xilol - dois banhos de 5 minutos cada. As lâminas de vidro foram então montadas com lamínulas de vidro e resina.

Como controles positivos foram utilizados casos de infecção por HPV em mucosa anogenital previamente testados e positivos para as sondas e método em questão.

4.3 Características Histopatológicas

A avaliação do quadro histopatológico dos espécimes selecionados levaram em consideração os seguintes parâmetros:

1. Cariorrexia
2. Disqueratose
3. Coilocitos
4. Células Bi ou Multinucleadas
5. Alteração de Cromatina
6. Hiperchromatismo Nuclear

Essas características foram levantadas por um único Patologista através da leitura das lâminas com diagnóstico histopatológico de papiloma .

Após observar cada aspecto histológico acima citado anteriormente, comparou-se a frequência desses achados com os resultados das reações de hibridização *in situ* e PCR para marcação do HPV.

4.4 Análise e critérios adotados para a interpretação dos resultados da técnica de hibridização *in situ*

A análise dos resultados da técnica de hibridização *in situ* foi feita mediante uma avaliação qualitativa da presença de células positivas para HPV em microscopia de luz por dois observadores. Foram consideradas positivas as células epiteliais que apresentaram sinal de hibridização, representado por pequenos pontos acastanhados e/ou coloração acastanhada difusa no núcleo celular. A intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas não foram levadas em consideração.

4.5 Reação de PCR para HPV

Para a extração do DNA de todas as amostras foi utilizado o sistema QIAamp (QIAGEN Ltd) seguindo-se as especificações do fabricante.

A partir de cada caso de papiloma emblocado em parafina foram obtidos de 10 a 20 cortes de 10 µm de espessura. Esse material em condições estéreis foi depositado em tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para a desparafinização deste material foi adicionado aos tubos 1 ml de xilol aquecido a 65 °C por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm por três minutos, desprezando-se o material sobrenadante e seguindo novas trocas de xilol aquecido, até remoção completa da parafina. O corpo de fundo do tecido foi hidratado em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto, etanol 95% e etanol 70 % em água milli-Q). Cada troca foi precedida de homogeneização e centrifugação a 10.000 rpm durante três minutos, em temperatura ambiente.

Após a remoção da parafina foi feita a incubação das amostras em proteinase K em estufa a 55°C, com agitação suave constante, por um período de 18 horas. Então, as amostras foram purificadas pela lavagem e centrifugação através de colunas de filtragem. Na última etapa o DNA foi removido do filtro e suspenso em tampão fornecido pelo fabricante.

As amostras de DNA obtidas foram amplificadas pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction, Invitrogen) através de iniciadores para o DNA do HPV. Foram utilizados iniciadores degenerados senso e anti-senso GP5 – GP6 que amplificarão o produto de 200 pb.

Gene	GP5-GP6
Iniciador Senso	5 CGTCCMAARGGAWACTGATC 3
Iniciador antisenso	5 GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3
Produto	180 pb

Quadro 4.1. Dados referentes aos iniciadores GP5-GP6

As reações de PCR foram realizadas com 40 ciclos e temperatura de associação de 55 graus. Aos tubos Eppendorf foram acrescentados os seguintes reagentes: DNA, iniciadores senso e antisenso, dNTP , tampão (10 X) , magnésio, enzima Taq polimerase e água destilada / autoclavada para completar 25 µl de solução. A quadro 4.2 mostra as respectivas concentrações dos reagentes utilizados nessas reações.

Componente	Concentração
Tampão 10x	1x
Magnésio (Mg Cl ₂)	2,5 mM
dNTP (10 mM cada nt)	240 µM
Iniciador senso	5 pmol
Iniciador antisenso	5 pmol
Enzima Taq polimerase	2 U / 25 µl
DNA	4 µg / µl

Quadro 4.2 Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR.

Os tubos com os reagentes já citados foram levados ao termociclador PTC – 100 Peltier-Effect Cycling, no qual foram submetidos a um pré-tratamento de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de reação. Nesses ciclos ocorreu uma desnaturação de 95°C por 1 minuto, associação dos iniciadores a 55 °C por 60 segundos, extensão enzimática a 72 °C por 60 segundos, após o ciclo final houve uma extensão adicional de 5 minutos a 72 °C.

Os resultados foram avaliados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio e visualizados em um transiluminador com luz UV, e a seguir fotografados em uma câmera digital para documentação.

4.6 Análise e critérios adotados para os resultados da técnica da PCR

Através da leitura das bandas iluminadas pelo transiluminador com lâmpada ultravioleta, foi possível determinar a amplificação ou não do DNA das amostras. Usamos como referência um marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder), um controle positivo que mostrava as bandas iluminadas na região de 400pb a 200 pb). A positividade deste exame de PCR garante que o DNA em estudo está íntegro e viável para a pesquisa como mostra a figura 4.1

Figura 4.1- Gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação por PCR do DNA da lesão mostrando da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular (LM), o controle positivo (C+) com bandas iluminadas para 200pb e 400pb, as 10 amostras e o controle negativo (C-)

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

Quanto à idade dos pacientes, observamos que houve predileção pelas 2^a, 4^a, 5^a e 6^a décadas de vida, sendo que a mediana de idade foi de 43 anos (alcance 04 a 76 anos). Quanto ao sexo, observamos uma predileção muito discreta pelo sexo masculino (54%) e feminino (46%), na proporção de 1,17: 1, sem significância estatística. O sítio mais afetado foi palato (34%), seguido por língua (26%), lábios (16 %), mucosa jugal (6 %), comissura labial (4%), rebordo alveolar (4%), freio (2 %), pilar amigdaliano (2%), úvula (2%), gengiva (2%) e assoalho bucal (2 %). Quanto à raça dos casos analisados houve uma predileção expressiva pelos leucodermas (72%), seguido de melanodermas (18 %) e xantodermas (10 %). Os resultados referentes à idade, sexo, raça e localização estão resumidos na tabela do Anexo D e as figuras 5.1, 5.2 e 5.3 abaixo demonstram aspectos clínicos e localizações mais freqüentes.

5.1

5.2

5.3

Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 – Aspectos clínicos gerais e localizações mais freqüentes

5.2 Características Histopatológicas

Para os resultados referentes as características histopatológicas levantadas na leitura das lâminas, foram levadas em consideração as seguintes características: células bi ou multinucleadas, cariorrex, células semelhantes a coilócitos (coilocitose), alteração da cromatina e hipercromatismo nuclear. Os resultados referentes estão resumidamente abaixo no gráfico 5.4 e a presença de cada característica histopatológica encontrada nos papilomas estão representadas pelas figuras 5.4 (A, B,C,D, E, F).

Gráfico 5.4 - Características histopatológicas encontradas nos papilomas

Figura 5.4 - Características histopatológicas do papiloma: A. Quadro histopatológico exibindo células semelhantes a coilócitos (HE 20X); B. Quadro histopatológico exibindo hiper cromatismo nuclear (HE 20 X); C. Quadro histopatológico exibindo alteração de cromatina e cariorrexis (HE 20X)

Figura 5.4 - Características histopatológicas do papiloma:
D. Quadro histopatológico exibindo cariorrexis (HE 20X); E. Quadro histopatológico exibindo disqueratose (HE 20X) F. Quadro histopatológico exibindo células binucleadas (HE 20X).

5.3 Positividade para a sonda HPV de amplo espectro na CSA-ISH

Figura 5.4 - G. Reação de hibridização *in situ* demonstrando marcação positiva (Controle positivo - Anogenital) para o HPV; H. Reação de hibridização *in situ* demonstrando marcação negativa para o HPV

Dentre os 50 casos selecionados nesse estudo submetidos à hibridização *in situ* com sonda HPV de amplo espectro, Zero (100%) apresentaram marcação negativa para o HPV.

5.4 Amplificação para a sonda HPV de amplo espectro na PCR

Dentre os 50 casos selecionados nesse estudo, foram selecionados 10 casos significantes e submetidos à técnica de PCR com sonda HPV de amplo espectro e Zero (100%) não apresentaram amplificação para marcação do HPV.

Figura 5.5 - Gel de agarose 2% mostrando resultado da amplificação por PCR do DNA da lesão mostrando da esquerda para a direita, o marcador de peso molecular (LM), o controle positivo (C+) com bandas iluminadas para 200pb e 400pb, as 10 amostras e o controle negativo (C-)

Figura 5.6 - Imagem da PCR mostrando negatividade em todos os casos (1-10). Observar os marcadores de peso molecular (LM) na primeira coluna, os dois controles positivos C+, na segunda e terceira coluna, e o controle negativo na última coluna

6 DISCUSSÃO

O HPV está fortemente associado como fator etiológico no desenvolvimento de lesões de pele e trato genital e também do papiloma oral. Apesar de algumas pesquisas citarem índices diferentes de infecção por HPV em papilomas orais esses podem variar de acordo com: a quantidade de DNA viral, a variabilidade das técnicas, o tamanho macroscópico do espécime obtido e a utilização de tecidos frescos ou emblocados em parafina, porém há um consenso na literatura que todas essas variáveis podem influenciar diretamente na detecção do DNA viral do HPV.

Considerado como um tumor benigno epitelial (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985; SOARES et al., 2005), o papiloma oral foi associado ao HPV. Foram os estudos como o de Shope e Hurst (1933) e posteriormente por Koss e Durfee (1956) que começaram a evidenciar a presença de infecção por HPV no desenvolvimento de lesões inclusive dos papilomas.

O papiloma oral afeta ambos os sexos eqüitativamente com maior incidência entre as 3^o.e 5^o. décadas de vida (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; COSTA et al., 1994; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; GREER; GOLDMAN, 1974; WARD et al.,1995; YAMAGUCHI et al. 1998). Os 50 casos analisados neste estudo apresentaram discreta predileção pelo sexo masculino (54%) e média de idade de 43 anos corroborando com os achados na literatura.

O local de predileção do papiloma oral é a língua seguido do palato e lábio, sendo menos freqüente em outras regiões da mucosa oral (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; COSTA et al., 1994; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; GREER; GOLDMAN, 1974; WARD et al.,1995; YAMAGUCHI et al.

1998). Os resultados apresentados neste estudo em relação à localização são diferentes da literatura porque o palato (34%) seguido da língua (26%), foram os sítios de predileção da lesão nos 50 casos. Quando realizado levantamento em relação à raça, a predominância é absoluta dos leucodermas (72%) seguido dos melanodermas com 18% dos casos e apenas 10% de xantodermas, mostrando resultados bastante semelhantes ao encontrado na literatura com média de 83% para os leucodermas, 12% para melanodermas e sem citação para os xantodermas (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; OSHIRO et al., 1996; SOARES et al., 2005).

O diagnóstico do papiloma oral é um fator bem definido na literatura, com correntes de autores que afirmam que o seu diagnóstico está baseado nas aparências clínicas e histológicas. O aspecto clínico do papiloma oral é característico e apresenta-se como um crescimento exófito, peduncular, indolor, menor que 10mm, cuja superfície mostra projeções digitiformes ou verrucosas, mais comumente encontrado em língua e palato. O tratamento é cirúrgico com pequena margem de segurança para evitar a ocorrência de recidivas e o diagnóstico diferencial se faz com verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal e condiloma acuminado (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; CHANG et al., 1991; EVERSOLE; LAIPIS, 1988; LOPES; MEEKS, 2001; SYRJANEN, 2003; WARD et al., 1995; YAMAGUCHI et al. 1998).

O quadro histopatológico do papiloma oral é caracterizado por uma proliferação do epitélio escamoso estratificado queratinizado, múltiplas projeções papilomatosas com áreas centrais de tecido conjuntivo fibrovascular, estes podem apresentar componentes inflamatórios dependendo do trauma causado na lesão. Frequentemente encontra-se hiperqueratose, disqueratose, papilomatose, acantose e coilocitose (ABBEY; PAGE; SAWYER, 1980; BODINI; FIAMMINGHI, 1989; COSTA

et al., 1994; CHANG et al., 1991; GREER; GOLDMAN, 1974; OSHIRO et al., 1996; SILVA; QUEIROZ, 2006; SOARES et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 1998), resultados semelhantes encontrados nos papilomas deste estudo. Foram adicionados características histopatológicas como cariorrexis, alteração de cromatina, hipercromatismo nuclear e células bi ou multinucleadas para associar à lesão com a infecção por HPV de acordo com um protocolo citomorfológico cérvico-uterino proposto por Yamamoto et al. (2004), que o utilizaram para aumentar a especificidade de testes que detectam a presença de infecção por HPV. Porém em nossos estudos essas características adicionais não tiveram relevância na pesquisa da presença de DNA viral do HPV.

A presença de coilócitos não refletiu neste estudo infecção por HPV. Antigamente considerado como um sinal patognomônico, hoje sabe-se que essas alterações celulares e associados a outras características histológicas são usadas apenas como uma sugestão de infecção por HPV, necessitando que se realize algum teste para detecção do vírus (FORNATORA et al., 1996; ZIOL et al., 1998), porém em infecções latentes essas técnicas podem estar limitadas, porque as células infectadas geralmente se encontram nas camadas supra basal e basal e o HPV nessa condição não expressa suas oncoproteínas virais e portanto, por estarem inativas, não interferem no ciclo celular e conseqüentemente não são passíveis de detecção do vírus de acordo com Campisi et al. (2006).

Em nossos estudos apesar da presença expressiva de coilócitos (98% - 50 casos) que é uma das características histopatológicas que sugerem a presença de infecção por HPV, não foram suficientes para influenciar um resultado positivo pelas técnicas de hibridização *in situ* e PCR, fato este comprovado em diversos estudos

que não há nenhuma correlação histológica com os casos positivos para HPV (EVERSOLE; LAIPIS, 1988; YOUNG; MIN, 1991; ZEUSS; MILLER; WHITE, 1991).

Nenhuma das características histopatológicas consideradas neste estudo pode correlacionar-se com a detecção do HPV, o que impossibilitou a utilização desses padrões histopatológicos para determinar presença de DNA viral do HPV no papiloma, devendo para tanto ser utilizada as técnicas de hibridização *in situ* e PCR para essa detecção.

Os 50 casos utilizados nesse estudo não puderam formar estreita relação entre os achados clínicos, histológicos e testes para detecção de DNA viral com a infecção por HPV utilizando sondas de amplo espectro tanto em CSA-ISH como na PCR. Isto está em desacordo com a literatura, que apesar dos diferentes índices de infecção por HPV, os estudos realizados comprovam a íntima relação entre essa lesão e HPV quando utilizam a técnica de hibridização *in situ* com sondas específicas e de amplo espectro em blocos parafinados de lesões diagnosticadas como papiloma. Os autores Dhariwal, Cubie e Southam (1995), Loning et al. (1985), Syrjanen, Syrjanen e Lamberg (1986) utilizaram 3, 5 e 7 casos de papiloma dos quais foram positivos 33.3%, 80% e 57% respectivamente.

Os trabalhos de Lopes e Meeks (2001), Ward et al. (1995) e Eversole e Laipis (1988) utilizaram 16, 19 e 20 casos de papiloma dos quais 52.2%, 68% e 35% respectivamente foram positivos para marcação do HPV. Young e Min (1991), Jimenez et al. (2001) e Zeuss et al. (1991) fizeram uso de 21, 27 e 30 casos dos quais 62%, 40% e 13.3% respectivamente apresentaram marcação positiva para HPV. Os 92 casos selecionados por Syrjanen et al. (1987) apresentaram 48.9% de positividade.

Todos esse estudos permitem a relação do papiloma com o HPV de 13 a 80% dos casos (média 48.9%), ressaltando que nos casos negativos os autores afirmam tal fato que a baixa detecção pode ser causada pela pequena quantidade de DNA, ausência de DNA viral nos cortes do tecido, infecções com poucas cópias virais, infecções latentes e sensibilidade dos métodos utilizados. E em relação aos aspectos histopatológicos também não houve correlação tanto nos casos positivos e negativos.

A técnica empregada nesse estudo é amplamente utilizada já que é possível realizar a reação a partir de uma secção tecidual e nesse estudo foram utilizados 2 cortes, porém o ideal seriam a partir de 3 cortes. Entretanto a técnica de ISH convencional apresenta pouca sensibilidade, pois detecta a partir de 10 a 50 cópias do DNA viral, isto é, particularmente insatisfatório, porque o HPV faz lesões pouco produtivas na mucosa oral. Estratégias para otimizar uma melhor detecção por ISH têm sido desenvolvidas como a CSA-ISH, e já existem sistemas de amplificação disponíveis que eficazmente aumentam sua sensibilidade com a possibilidade de localização do DNA viral no tecido analisado.

Nesse estudo optamos por usar o método CSA-ISH (com controles positivos e otimizados para lesões anogenitais). Baseado na amplificação catalisada de sinais positivos de hibridização pelo complexo biotiniltiramida. Esse sistema mostrou-se muito sensível para detecção de DNA viral do HPV e de acordo com os autores com sensibilidade comparável à PCR (DABIC et al., 2004; FREGONESI et al., 2003). Porém ainda insuficiente devido ao baixo número de cópias virais que o HPV produz nos papilomas da mucosa oral e também por ter sido utilizado 2 kits com lotes diferentes , ou ainda porque o DNA estava degradado. Nota-se que a técnica

realizada foi realizada de forma adequada e satisfatória comprovado pelo resultado positivo em lesão anogenital, sem background, através do protocolo do fabricante.

A proposta de verificação do sucesso da técnica em todas as etapas é a utilização de uma sonda de controle positivo que se anela ao DNA humano, ou seja, se a técnica e outras etapas como a fixação estiverem corretas, o resultado deverá ser positivo. Caso esse DNA estiver intacto, teoricamente a sonda conseguirá se anelar e proporcionar resultado positivo, se negativar pode ser um indício de DNA degradado, se o mesmo foi perdido, provavelmente o DNA viral também foi perdido.

Existe uma diversidade de técnicas utilizadas para a detecção do HPV em lesões da mucosa oral e outros sítios anatômicos que permitem a grande variedade de resultados encontrados na literatura. A maioria dos estudos utilizam a técnica, PCR, combinada ou não a outras técnicas, para detectar DNA viral de HPV em tecidos que apresentam diferentes formas de armazenamento e conservação. A razão pela qual se utiliza a PCR é por ser uma técnica com maior sensibilidade entre as disponíveis para detecção do HPV, sendo teoricamente mais confiável, porém também com possibilidade de resultado falso-negativo.

Na literatura é indiscutível e bem consolidada a técnica da PCR como “gold standard” para detecção do HPV (DABIC et al., 2004; HA; CALIFANO, 2004; HUBBARD, 2003; NUOVO, 2006). Porém essa técnica como todas existentes, apresentam suas limitações. A quantidade de tecido necessária para a extração de DNA a ser utilizada na reação é uma delas. Nesse estudo foram utilizados material arquivado, restante de biópsias emblocadas em parafina, e esse material utilizado geralmente apresenta-se em pequeno tamanho devido às próprias características do papiloma e o processo de formolização, parafinização e posterior desparafinização, promovem um enovelamento de proteínas no núcleo, ligações entre proteínas e

DNA, assim como a própria desfragmentação do DNA tornando a detecção viral dificultada e até impossível (MESQUITA et al., 2001). Estas podem ser as razões pelas quais alguns estudos, mesmo utilizando técnicas mais sensíveis, encontram resultados muito próximos de zero ou iguais a zero como o estudo de Rivero e Nunes (2006), quando se pesquisa HPV em lesões da mucosa oral.

Estratégias têm sido desenvolvidas para superar os problemas de que as lesões estão emblocadas em parafina e são submetidas à técnica da PCR. A Nested-PCR é uma poderosa ferramenta como técnica; capaz de amplificar seqüências de DNA sucessivamente aumentando a sensibilidade e a especificidade da reação. A utilização de dois pares de primers de PCR são usados para amplificar o fragmento; enquanto um par é usado para amplificar um fragmento em um PCR padrão, o segundo par se une a esse produto obtido na PCR padrão possibilitando uma amplificação em um segundo PCR. A vantagem e a lógica da Nested-PCR consiste na possibilidade de ter sido amplificado erroneamente um fragmento, a probabilidade é muito baixa de se obter um produto amplificado pela segunda vez por esses segundos set de primers, isso aumenta consideravelmente a sua sensibilidade e especificidade em relação à PCR padrão (BERKHOUT et al., 1995).

Existem estudos na literatura que encontram melhores resultados com PCR do que com a CSA-ISH em tecidos emblocados em parafina (DABIC et al., 2004), mas o grau de concordância entre os métodos utilizados na literatura é muito variável. Apesar disso, estudos concordam e comprovam que a CSA-ISH é um método mais confiável e sensível que a ISH convencional na detecção do HPV em conjunto com a análise morfológica tecidual, ainda que o ideal seja usado juntamente com a técnica de PCR.

Nesse sentido estamos nos dedicando com a continuidade desse estudo para solucionar e otimizar as técnicas utilizadas continuando com os casos de papilomas orais disponíveis nos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal e Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para confirmar ou inferir estes nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

1. O papiloma ocorreu em sua maioria em indivíduos leucodermas (72%), afetando mais o sexo masculino (54%), com idade média de 43.08 anos e o local de predileção da lesão foi o palato (34%).
2. Nenhuma das características histopatológicas consideradas neste estudo pode correlacionar-se com a detecção do HPV, o que impossibilitou a utilização desses padrões histopatológicos para determinar a presença do HPV.
3. O índice de detecção do HPV nos 50 casos foi Zero (100%) pela técnica de hibridização *in situ* com sinal amplificado.
4. O índice de detecção do HPV em 10 dos mesmos 50 casos também foi Zero (100%) pela técnica da PCR.
5. Os resultados obtidos, mesmo que negativos, sugerem uma baixa presença de HPV em lesões da mucosa oral.

REFERÊNCIAS¹

Abbey LM, Page DG, Sawyer DR. The clinical and histopathologic features of a series of 464 oral squamous cell papillomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:419-24.

Berkhout RJM, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JNB, Vermeer BJ, Schegget. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis – associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1995;690-5.

Bishop, JW, Emanuel JM, Sims KL. Disseminated mucosal papilloma/condyloma secondary to humanpapillomavirus. *Am J Surg Pathol* 1998;22(10):1291-95.

Bodini G, Fiamminghi L. Papillomi del cavo orale. *Dent Cadmos* 1989;57(5):68-77.

Brito, H, Vassallo J, Altemani, A. Detection of Human Papillomavirus in laryngeal squamous dysplasia and carcinoma. An *In situ* hybridization and signal amplification study. *Acta Otolaryngol* 2000;120:540-4.

Campisi G, Giovannelli L, Calvino F, Matranga D, Colella G, Di Liberto C, et al. HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. *Oral Oncol* 2006;42(6):638-45.

Chang F, Syrjanen S, Kellokoski J, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *Oral Pathol Med* 1991;20(7):305-317.

Costa LJ, Silveira FRX, Batista JM, Birman ES. Human Papilloma Virus– its association with epithelial proliferative lesions. *Braz Dent J* 1994;5(1):5-10.

Dabic MM, Hlupic L, Babic D, Jukic S, Seiwert S. Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification *in situ* hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch Med Res* 2004;35(6):511-6.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2620-6.

Dhariwal SK, Cubie HA, Southam JC. Detection of papillomavirus in oral lesions using commercially developed typing kits. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:60-3.

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

Eversole LR, Laipis PJ. Oral squamous papillomas : Detection of HPV DNA by in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65(5):545-50.

Fornatora M, Jones AC, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biological potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(1):47-56.

Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Benatti-Neto C, de Oliveira MR, Soares CP. p16 (INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003;51(10):1291-7.

Greer RO, Goldman HM. Clinicopathologic evaluation and retrospective examination for dyskeratosis in 110 lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;38(3):435-40.

Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(4):188-96.

Herrington CS. Demystified...*in situ* hybridisation. *Mol Pathol* 1998;51(1):8-13.

Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(8):940-5.

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

Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956;63:1245-61.

Kurose K, Terai M, Soedarsono N. Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal mucosa among volunteers on Miyako Island. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:91-6.

Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and Invasive Carcinomas for Human Papillomavirus Type Related DNA. *J Invest Dermatology* 1985;84:417-20.

Lopes SMP, Meeks VI. Analysis of HPV 16 and 18 by *in situ* hybridization in oral papilloma of HIV+ patients. *Gen Dent* 2001; 49:386-89.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesq Odontol Bras* 2001;15(4):314-319.

Min B, Baek J, Shin K, Gujuluva CN, Cherrick HM, Park N. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinomas cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B(5):338-45.

Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Door L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;32S- S43-S51.

Nuovo GL. The surgical and cytopathology of viral infections: utility of immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and *in situ* polymerase chain reaction amplification. *Ann Diagn Pathol* 2006;10(2):117-31.

Oliveira DT, Moraes RV, Fiamengui JF, Fanton J, Landman G, Kowalski LP. Oral verrucous carcinoma: a retrospective study in São Paulo region, Brazil. *Clin Oral Investig* 2006;10:205-9.

.

Oliveira MC, Andrade MC, Soares RC, Costa ALP. Aspectos morfológicos que sugerem a presença do Papilomavírus Humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. *Rev Bras Patol Oral* 2005;1:1-14.

Oshiro V, Lopes NNF, Santos GG, Marcucci G. Papiloma bucal: estudo clínico, diagnóstico e terapêutica de 105 casos. *Rev Paul Odont* 1996;5:4-12.

Pignatari SSN, Weckx LLM, Bordasch A. Biologia molecular no diagnóstico das infecções por Papilomavírus Humano (HPV) em otorrinolaringologia. Rev Bras Otorrinolaringol 1995;61(2):91-5.

Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. Pesqui Odontol Bras 2006;20(1);21-4.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. Oral Oncol 2002;38(3):227-34.

Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: Their possible role in oral disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985;60(2):166-74.

Shope RE, Hurst WE. Infectious papillomatosis of rabbits: With a note on the histopathology. The Journal of Experimental Medicine 1933;58:607-24.

Silva FWGP, Queiroz AM. Oral papilloma in pediatric patients. Braz J Oral 2006;60:938-40.

Soares RC, Campelo AJT, Oliveira MC, Galvão HC. Lesões Verrucosas Oraís RGO 2005;53(3):201-5.

Souto R, Falhari JPB, Cruz AD. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. Rev Bras Canc 2005;51(2):155-60.

Syrjanen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. Mod Microbiol Immunol 2003;192:123-8.

Syrjanen S, Syrjanen KJ, Lamberg MA. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986;62(6):660-7.

Syrjanen SM, Syrjanen MK, Happonen RP, Lamberg MA. In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosal lesions. Arch Dermatol Res 1987;279:543-9.

Terai M, Takagi M. Human papillomavirus in the oral cavity. *Oral Med Pathol* 2001;6:1-12.

Tinoco JA, Silva AF, Oliveira CA, Rapoport A, Fava AS, Souza RP. Correlação da infecção viral pelo papilomavírus humano com as lesões papilomatosas e o carcinoma epidermóide de boca. *Rev Assoc Med Bras* 2004;50(3):252-6.

Ward AK, Napier SS, Winter PC, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:63-6.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel-Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64(11):3878-84.

Yamaguchi T, Shindoh M, Amemiya A, Inoue N, Kawamura M, Sakaoka H, et al. Detection of human papillomavirus type 2 related sequence in oral papilloma. *Anal Cell Pathol* 1998;16:125-30.

Yamamoto LSU, Alves VAF, Maeda MYS, Longatto-Filho A, Utagawa ML, Neto JE. A morphological protocol and guide- list on uterine cervix cytology associated to papillomavirus infection. *Rev Inst Med Trop SP* 2004;46(4):189-93.

Young SK, Min KW. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71(6):714-9.

Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:714-20.

Ziol M, Di Tomaso C, Biaggi A, Tepper M, Piquet P, Carbillon L, et al. Virological and biological characteristics of cervical intraepithelial neoplasia grade I with marked koilocytotic atypia. *Hum Pathol* 1998;29(10):1068-73.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 150/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Deteção e tipagem do Papilomavírus Humano (HPV) em mucosa bucal*", de responsabilidade do Pesquisador **Ângelo Rafael Calábria Tancredi**, sob orientação do Professor Doutor **Gilberto Marcucci**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 16 de novembro de 2005

Prof. Dr. Rogério Rogusina de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 150/05

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente as alterações no método retirando a técnica de Biologia Molecular PCR e do título do projeto inicialmente denominado "Detecção do papilomavírus humano (HPV) em mucosa bucal" para "Estudo clínico, epidemiológico e histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através da técnica de hibridização in situ", de responsabilidade do Pesquisador Ângelo Rafael Calábria Tancredi, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Gilberto Marcucci.

São Paulo, 01 de outubro de 2007.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887

Anexo C – Parecer do Comitê de Ética FOU SP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****DECLARAÇÃO
Protocolo 150/05**

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente as alterações no método e no título do projeto inicialmente denominado "Detecção do papilomavírus humano (HPV) em mucosa bucal" para "Estudo clínico, epidemiológico e histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com o Papilomavírus humano (HPV) através da técnica de hibridização in situ e PCR", de responsabilidade do Pesquisador Ângelo Rafael Calábria Tancredi, sob orientação do Professor Doutor Gilberto Marcucci.

São Paulo, 18 de outubro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo D – Dados referentes a sexo, raça, idade e localização dos pacientes portadores de papiloma

Caso	Sexo	Cor	Idade	Localização
1	F	N	4	GENGIVA
2	M	B	48	PALATO
3	F	A	44	PALATO
4	M	B	13	LÍNGUA
5	M	B	14	LÁBIO
6	F	B	32	COMISSURA LABIAL
7	F	B	7	PALATO
8	F	B	48	PALATO
9	F	B	62	PALATO
10	F	B	58	PALATO
11	F	B	66	PALATO
12	M	B	32	PALATO
13	F	N	12	LÁBIO
14	M	N	24	ÚVULA
15	M	B	6	LÁBIO
16	M	B	47	LÁBIO
17	M	B	43	LÁBIO
18	F	B	47	LÍNGUA
19	M	B	51	LÁBIO
20	F	B	48	ASSOALHO DE BOCA
21	M	B	43	PALATO
22	F	B	50	LÍNGUA
23	M	B	76	MUCOSA JUGAL
24	M	B	25	PALATO
25	M	N	42	PALATO
26	M	B	32	LÍNGUA
27	F	B	50	LÁBIO
28	M	B	68	LÍNGUA
29	M	B	68	REBORDO ALVEOLAR
30	F	B	70	PALATO
31	M	B	37	PALATO
32	F	A	56	MUCOSA JUGAL
33	M	B	34	PALATO
34	M	N	42	PALATO
35	M	N	58	LÁBIO
36	F	B	46	LÍNGUA
37	F	B	52	LÍNGUA
38	F	N	27	MUCOSA JUGAL
39	F	B	52	PILAR AMIGDALIANO
40	F	A	57	LÍNGUA
41	F	A	60	LÍNGUA
42	F	B	54	LÍNGUA
43	F	N	8	COMISSURA LABIAL
44	F	B	68	PALATO
45	M	A	50	PALATO
46	F	B	28	LÍNGUA
47	M	B	68	LÍNGUA
48	F	B	50	REBORDO ALVEOLAR
49	M	N	42	FREIO LABIAL
50	F	B	35	LÍNGUA