The background of the entire page is a microscopic image of numerous red blood cells. These cells are biconcave discs, appearing as light pink or reddish spheres with a darker, indented center. They are densely packed and overlap, creating a textured, organic pattern that fills the entire frame. The lighting is soft, highlighting the smooth surface and the central depression of the cells.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO

**ESTUDO CLÍNICO, CITOLÓGICO E DE PREVALÊNCIA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MUCOSA ORAL NA
ANEMIA DE FANCONI**

**BAURU
2008**

MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO

**ESTUDO CLÍNICO, CITOLÓGICO E DE PREVALÊNCIA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MUCOSA ORAL NA
ANEMIA DE FANCONI**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia
Orientadora: Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen.
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

**BAURU
2008**

Araujo, Melissa Rodrigues de

Ar15e Estudo clínico, citológico e de prevalência do papilomavírus humano em mucosa oral na Anemia de Fanconi / Melissa Rodrigues de Araujo. – Bauru, 2008. 221p; il.; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen

Co-orientador: Prof Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/____

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em Seres humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.
Protocolo nº 1131.170/2005-11.
Data: 30/11/2005

DADOS CURRICULARES

Melissa Rodrigues de Araujo

19 de janeiro de 1980	Nascimento Maringá – PR
1998 - 2002	Graduação em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
2003 - 2004	Mestrado em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
2005 - 2007	Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, Regional Bauru.
2005 - 2008	Doutorado em Estomatologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo e estágio de Doutorado no Exterior na Universidade de Torino, Itália.
Associações	Conselho Regional de Odontologia do Paraná Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria dos Anjos,

Que é minha eterna luz, meu eterno brilho e minha eterna fonte de forças para enfrentar as dificuldades. Em quem eu me espelho para tentar ser cada dia uma pessoa melhor.

Quem sempre me deu mais do que amor e carinho, me ensinou a dar meus próprios passos e ir em busca dos meus ideais.

Mãe, você plantou uma sementinha, que agora está começando a dar frutos. Tenho a plena convicção que você está vibrando bem pertinho de mim.

A saudade será eterna...

Ao meu pai, Osvaldo

Meu herói e amigo, que sempre me apóia, me incentiva e vibra com cada passo que eu dou.

Agradeço pelas palavras meigas que me confortam nos momentos difíceis, pelo colo que sempre me acolhe e pelas nobres lições.

Paí, você é tudo para mim!

Ao Luiz Alkimin, o meu Kima

*Meu amor, agradeço por ser sempre um grande incentivador e
companheiro.*

Obrigada por você estar sempre ao meu lado, pela compreensão dos longos anos de ausência e acima de tudo pela incansável paciência e vontade de aprender um pouquinho de Odontologia.

Muito pouco ama, quem com palavras pode expressar quanto muito ama.

Dante Alighieri

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Rodrigo e Rafael, pela compreensão da minha ausência. Meu amor por vocês é incondicional e eterno.

À toda minha amada família: meus avós, tios, tias, primos e primas, vocês são muito importantes para mim.

Aos meus orientadores da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, a profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen e o prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

À Dra. Izabel, por ser sempre muito carinhosa, dedicada e incentivadora. Meu muito obrigada pelos ensinamentos durante estes anos de pós-graduação.

Ao Dr. Carlos F. Santos, um grande professor e ser humano. Agradeço imensamente o incentivo e a confiança depositados em mim. A sua capacidade intelectual, competência e dedicação são verdadeiros exemplos.

Ao Dr. Franco Merletti, Dra. Anna Gillio-Tos e Dra. Laura De Marco do Departamento de Epidemiologia de Tumores da Universidade de Torino, Itália, um departamento de pesquisa exemplar. Serei eternamente grata pela acolhida carinhosa, pela prontidão e disponibilidade em ensinar. Agradeço a oportunidade desta valiosa experiência que vivenciei.

Aos professores do Departamento de Estomatologia profa. Dra. Ana Lúcia Alvares Capelloza, prof. Dr. José Humberto Damante, prof. Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato, prof. Dr. Eduardo Sant'Ana e prof. Dr. Osny Ferreira Júnior, por me ensinarem a importância da prática clínica na Estomatologia e despertarem em mim cada vez mais a paixão pela docência.

Ao professor Dr. Antonio Adílson Soares de Lima agradeço todas as sugestões, comentários e orientações desde a minha graduação, além das que enriqueceram este trabalho. Obrigada por ter gentilmente cedido o laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR para a realização da citologia e análise citomorfométrica.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro; à Presidente da Comissão de Pós-Graduação Profa. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Estomatologia e Biologia Oral Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues e a vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lúcia Alvares Capellozza.

Aos meus colegas de pós-graduação Carla Ruffeil Moreira, Cassia Maria Fischer Rubira, Cláudio Gaião Xavier, Etienne de Andrade Munhoz, Gustavo de Almeida Lautenschlager, Josiane Sá, Letícia Rodrigues Nery, Marcelo Zanda, Moacir Tadeu Vicente Rodrigues, Renato Yaedú, pela agradável convivência.

Especialmente agradeço às grandes amigas que fiz durante o curso: Danielle Frota de Albuquerque, Marta da Cunha Lima e Renata Cordeiro Teixeira, vocês realmente fizeram a diferença. Pelo grande companheirismo e amizade.

“Quem tem um amigo pode morrer de saudades, mas nunca morrerá de solidão”...

(AMYR KLINK)

À cirurgiã-dentista Adriana Bueno Batista pela grande contribuição na coleta de dados, processamento e organização das lâminas da citologia. Você foi essencial para o andamento da pesquisa.

Ao Thiago José Dionízio pela enorme paciência em ensinar e ajudar todos os alunos nas pesquisas no laboratório de Farmacologia da FOB-USP. Pela incontestável contribuição nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ignácio, Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris e Loredana Vizzini pela realização da análise estatística.

À Marília Gião, pela sua atenção e disponibilidade. Agradeço também aos funcionários do departamento de Estomatologia, Radiologia e Cirurgia: Josieli Farinha, Elza Cassalate, Patrícia de Sá Mortáquia, Fernanda Aparecida Daniel Cavallari, Reinaldo Vieira, Roberto Ponce Salles, Luciana Zanon Fontes e Roque dos Santos pela disposição em ajudar e convívio agradável.

Aos funcionários da Biblioteca e a da Secretaria de Pós-graduação por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Dr. Ricardo Pasquini, aos médicos e funcionários do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR pela confiança depositada em mim, receptividade e atenção.

Aos pacientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR pela enorme colaboração e paciência.

À CAPES pela concessão da bolsa no Brasil e da bolsa-sanduíche pelo período de um ano na Universidade de Torino. Pela possibilidade de tornar a pesquisa mais acessível e o incentivo desta no Brasil.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,

nunca tem medo

e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

RESUMO

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara de herança recessiva caracterizada por insuficiência da medula óssea, anormalidades de desenvolvimento e malformações congênitas. A doença evolui para anemia aplástica grave em decorrência da falência progressiva da medula óssea e neoplasias malignas, principalmente a leucemia mielóide aguda e os carcinomas espinocelulares em região de cabeça e pescoço. O risco de desenvolvimento de neoplasias malignas aumenta após o transplante de medula óssea (TMO), e recentemente foi proposta a participação do papilomavírus humano (HPV) na carcinogênese na AF. Neste estudo foram realizados exame físico da boca, coleta de amostras de esfregaços de células epiteliais orais por meio da citologia em base líquida, avaliação quanto à presença de atipias de acordo com a classificação de Papanicolaou, análise citomorfométrica das células epiteliais orais, detecção do HPV por meio de técnicas de PCR e tipificação das amostras positivas por meio de hibridização reversa. A amostra foi dividida em 4 grupos: pacientes com AF transplantados (I) e não transplantados de medula óssea (II), pacientes com Anemia aplástica severa (AAS) transplantados (III) e um grupo de indivíduos saudáveis (controle) (IV). Ao exame físico não foram detectadas lesões malignas. Os resultados mostraram que, em comparação ao grupo controle: a) houve aumento da área do núcleo (NA) das células epiteliais orais na AF e na AAS ($p < 0,05$); b) houve aumento da área do citoplasma (CA) na AF ($p < 0,05$); c) houve diminuição da razão NA/CA na AF em pacientes transplantados ($p < 0,05$), aumento desta na AAS ($p < 0,05$) e ausência de alterações nos pacientes com AF não transplantados de medula óssea; d) foi encontrada alta prevalência do HPV nos pacientes transplantados de medula óssea para AF (35%, $p < 0,05$) e AAS (38%, $p < 0,05$), enquanto que nos pacientes com AF não transplantados (27,27%) não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (6,25%) e e) o HPV-16, de alto risco para transformação maligna, foi o genótipo mais freqüente (grupo I – 71,42%, grupo II – 33,33%, grupo III – 28,57%, grupo IV – 0%). O risco relativo em apresentar a infecção pelo HPV foi maior nos pacientes transplantados, tendo sido influenciado pela idade e pelo tempo de TMO. Em conclusão, estes resultados demonstraram que existem alterações na morfometria das células epiteliais orais na AF e há alta prevalência de HPVs, especialmente HPV-16, na boca de pacientes sem lesões orais malignas.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Papilomavírus humano. Citologia em base líquida. Reação em cadeia da polimerase. Hibridização reversa. Boca.

ABSTRACT

ABSTRACT

Clinical and cytological assessment and HPV prevalence in oral mucosal cells in Fanconi's Anemia

Fanconi's anemia (FA) is a rare recessive genetic disorder characterized by bone marrow failure, developmental malformations and congenital abnormalities. FA progressive bone marrow failure usually evolves to aplastic anemia and malignant neoplasias, especially acute myeloid leukemia and head and neck squamous cell carcinomas. The risk of malignancies is increased after bone marrow transplantation (BMT), and recently the role of human papillomavirus (HPV) in FA carcinogenesis was proposed. We performed an oral examination, liquid based cytology sampling of oral epithelial cells, assessment of atypias according to Papanicolaou classification, cytomorphometric analysis of oral epithelial cells, HPV screening by PCR and genotyping by reverse hybridization. Sample subjects were divided into 4 groups: BMT FA patients (I), not BMT FA patients (II), BMT severe aplastic anemia patients (SAA) and a healthy control group (IV). No malignant lesions were detected on oral examination. In comparison with the control group the results showed: a) an increase in the nuclear area (NA) in oral epithelial cells in FA and SAA ($p<0.05$); b) an increase in the cytoplasmic area (CA) in FA ($p<0.05$); c) a decrease in the NA/CA ratio in BMT FA patients ($p<0.05$), an increase of it in SAA ($p<0.05$) and no alterations in not BMT FA patients; d) a high HPV prevalence was detected in BMT FA (35%, $p<0.05$) and SAA patients (38%, $p<0.05$), whereas in not BMT FA patients (27.27%) there was not a significant statistical difference in comparison with the control group (6.25%) and e) the high risk, HPV-16, was the most frequent genotype (group I – 71.42%, group II – 33.33%, group III – 28.57%, group IV – 0%). HPV infection odds ratio adjusted for age and years of BMT showed an increase in HPV infection for both factors. In conclusion, results demonstrated that there were morphometric alterations in oral epithelial cells in FA and a high prevalence of oral HPV, especially HPV-16, in these patients without malignant lesions.

Keywords: Fanconi's anemia. Human papillomavirus. Liquid based cytology. Polymerase chain reaction. Reverse hybridization. Oral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática das regiões do genoma do HPV e localização de diferentes pares de primers	82
Figura 2 –	Desenho esquemático representando os pares de primers MY, GP e SPF, na região L1 do genoma do HPV	91
Figura 3 –	Delineamento experimental da pesquisa	104
Figura 4 –	Utilização da escova para coleta da amostra no palato duro (A) e língua (B)	106
Figura 5 –	Aparato laboratorial do Sistema Digene®	107
Figura 6 –	Quadro descritivo da seqüência da técnica de coloração de Papanicolaou	108
Figura 7 –	Captura da imagem com a objetiva 40X utilizando o programa Image-Pro Plus™	109
Figura 8 –	Mensuração da área do núcleo e do citoplasma utilizando o programa Image-Pro Plus	111
Figura 9 –	Exportação dos dados referentes às mensurações da área do núcleo e do citoplasma para o programa Microsoft Office Excel para Windows®	112
Figura 10 –	Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação	114
Figura 11 –	Perfil térmico das reações de amplificação para o par de primers MY09/MY11	115
Figura 12 –	Perfil térmico das reações de amplificação para o par de primers GP5+/GP6+	117
Figura 13 –	Perfil térmico das reações de amplificação do sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra	118
Figura 14 –	Etapas do processamento das tiras de nitrocelulose para a genotipagem do HPV com o sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra	120
Figura 15 –	Bancada com reagentes para a realização da hibridização reversa utilizando o sistema INNO LiPA Genotyping Extra	121

Figura 16 –	Canaletas com as tiras de nitrocelulose e solução de conjugado (à esquerda, líquido amarelo) para a evidênciação das bandas e tipificação do HPV e cronômetro (à direita)	121
Figura 17 –	Perfil térmico das reações de amplificação com o sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping	123
Figura 18 –	Etapas do processamento das membranas de nitrocelulose para a genotipagem do HPV com o sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping	124
Figura 19 –	Perfil térmico das reações de amplificação para o gene beta globina em PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green	127
Figura 20 –	Distribuição dos pacientes anêmicos e não anêmicos nos grupos estudados	133
Figura 21 –	Classificação das amostras dos esfregaços orais de acordo com a classificação de Papanicolaou e distribuição nos grupos estudados	134
Figura 22 –	Esfregaço das células epiteliais orais com coloração de Papanicolaou, classe I, ausência de inflamação	135
Figura 23 –	Esfregaço das células epiteliais orais com coloração de Papanicolaou, classe II, com presença cocos, debris e hifas fúngicas	135
Figura 24 –	Média e intervalo de confiança da área do núcleo (NA) nos grupos estudados	137
Figura 25 –	Média e intervalo de confiança da variável CA nos grupos estudados	137
Figura 26 –	Média e intervalo de confiança da razão NA/CA nos grupos estudados	138
Figura 27 –	Ilustração da PCR em tempo real para o gene beta globina com o sistema SYBR Green	139
Figura 28 –	Géis de agarose 2% revelando amostras positivas após a amplificação com os pares de primers MY09/MY11 (A) e GP5+/GP6+ (B)	140
Figura 29 –	Prevalência do HPV nos grupos estudados e classificação de acordo com o risco de transformação maligna	142

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição do sexo, idade e tempo de TMO de acordo com os grupos estudados	131
Tabela 2 –	Valores da área do núcleo (NA), área do citoplasma (CA) e razão NA/CA das células epiteliais da mucosa oral de acordo com os grupos estudados	136
Tabela 3 –	Detecção e genotipagem dos HPVs nas amostras estudadas.	140
Tabela 4 –	Distribuição das amostras positivas de acordo com os grupos estudados e genótipos encontrados	143
Tabela 5 –	Teste de independência para a variável prevalência do HPV entre os grupos estudados aplicando-se o teste exato de Fischer	144
Tabela 6 –	Risco relativo (OR) estimado e risco relativo ajustado em relação à idade, e respectivos intervalos de confiança (IC), para infecção pelo HPV nos grupos estudados	144
Tabela 7 –	Risco relativo (OR), risco relativo ajustado em relação à idade do paciente, ao tempo de TMO, e respectivos intervalos de confiança (IC), para infecção pelo HPV nos grupos I e III	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Anemia Aplástica Severa
AF	Anemia de Fanconi
ATG	Globulina antitimocítica
CA	Área do citoplasma
CEC	Carcinoma Espinocelular
Ct	Cycle threshold – ciclo limiar
DEB	Diepoxibutano
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPB1	Gene DP beta 1
EA-36	Corante Eosina Y
EBV	Epstein Barr vírus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	Fator de crescimento epidermal
EPO	Eritropoetina
FDA	Food and Drug Administration
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
G-CSF	Fator estimulante de colônias granulocíticas
GM-CSF	Fator estimulante de colônias grânulo-monocíticas
HHV	Herpes vírus humano
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPV	Papilomavírus humano
LCR	Região longa de controle
LMA	Leucemia mieloide aguda
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
MMC	Mitomicina C
NA	Área do núcleo
NA/CA	Razão núcleo:citoplasma
NaN ₃	Azida de sódio
NK	Células natural killer – exterminadoras naturais

OG-36	Corante Orange G
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio - risco relativo
PAS	Ácido periódico de Schiff
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRB	Proteína do retinoblastoma
PUC-PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
s	Segundo
STMO/HC	Serviço de Transplante de medula óssea do Hospital de Clínicas
TBE	Trisma base, ácido bórico, EDTA
TMO	Transplante de medula óssea
UAR	Ulceração aftosa recorrente
UCM	Universal collection médium
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNG	Enzima uracil-N-glicosilase
VLP	Virus-like particle – partículas tipo vírus
VZV	Vírus Varicela Zoster

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

μm^2	Micrômetro quadrado
=	Igual
>	Maior
$\leq$	Menor ou igual
®	Marca registrada
μl	Microlítro
dL	Decilitro
g	Força Centrífuga
mL	Mililitro
mM	Micromolar
Mm^3	Milímetro cúbico
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
™	Trademark

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	55
2	REVISÃO DA LITERATURA	59
2.1	ANEMIA DE FANCONI	61
2.1.1	Diagnóstico da AF	65
2.1.2	Manifestações orais	66
2.1.3	Tratamento	68
2.2	ANEMIA APLÁSTICA SEVERA	71
2.3	CITOLOGIA ESFOLIATIVA	73
2.3.1	Características celulares e classes citopatológicas	75
2.3.2	Citologia em base líquida	76
2.4	MANIFESTAÇÕES ORAIS E CITOLÓGICAS NAS ANEMIAS	78
2.5	PAPILOMAVÍRUS HUMANO	81
2.5.1	Deteção do HPV em mucosa oral clinicamente saudável	86
2.5.2	Deteção do HPV em lesões orais	87
2.5.3	Métodos de identificação do HPV	89
3	OBJETIVOS	95
3.1	OBJETIVOS GERAIS	97
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97
4	MATERIAL E MÉTODOS	99
4.1	DELINEAMENTO	101
4.2	AMOSTRA	101
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	102
4.4	COLETA DE DADOS	103
4.5	DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS	105
4.6	TÉCNICA DE CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA E PROCESSAMENTO LABORATORIAL	105
4.7	DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CITOLÓGICOS	109
4.8	ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA	110
4.9	EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS	112
4.10	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	113

4.10.1	PCR MY09/MY11	114
4.10.2	<i>Nested</i> PCR GP5+/GP6+	116
4.11	GENOTIPAGEM DO HPV	117
4.11.1	Sistema INNO LiPA	117
4.11.2	Sistema Digene Consensus High risk HPV Genotyping kit	122
4.12	SEQÜENCIAMENTO DO GENOMA DO HPV	125
4.13	PCR EM TEMPO REAL	126
4.13.1	Identificação e quantificação do gene Beta globina	126
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	127
5	RESULTADOS	129
5.1	EXAME FÍSICO	131
5.2	ANÁLISE CITOLOGICA E CITOMORFOMÉTRICA	133
5.3	PREVALÊNCIA DO HPV	138
6	DISCUSSÃO	145
6.1	ANEMIA DE FANCONI	147
6.2	EXAME FÍSICO	148
6.3	CITOLOGIA ESFOLIATIVA	153
6.4	DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DO HPV	159
6.5	MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV	167
7	CONCLUSÕES	173
	REFERÊNCIAS	177
	APÊNDICES	197
	ANEXOS	215

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma desordem genética recessiva caracterizada por falência medular acentuada (NAVARRETE; GUEVARA; SALAMANCA, 1993; OLIVEIRA; HAUFF, 1996; NETO, 1999; SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003). Fanconi, em 1927, foi o primeiro a relatar os casos de três irmãos com pancitopenia e anormalidades físicas. Casos subseqüentes foram diagnosticados clinicamente pela combinação de anemia aplástica e características físicas anormais (OLIVEIRA, 1988). A doença tem evolução grave para pancitopenia, leucemia e aumento da predisposição para tumores sólidos (ALTAY et al., 1997).

Esta doença é invariavelmente fatal, com início de suas manifestações clínicas na primeira década de vida, época em que o diagnóstico é realizado. A expectativa de vida é de 25 anos de idade (NOWZARI et al., 2001), bem como relatada de 16 anos (PASQUINI; NETO, 2001).

O diagnóstico é baseado em um aumento anormal de quebras cromossômicas espontâneas, mais especificamente numa nítida quebra cromossômica na presença dos agentes alquilantes bifuncionais, como o diepoxibutano (DEB), mitomicina C (MMC) e mostarda nitrogenada (MONDOVITS, 2001). Os pacientes apresentam hipersensibilidade aos agentes alquilantes resultando em inúmeras anormalidades cromossômicas e suscetibilidade aumentada em desenvolver neoplasias malignas (PASQUINI; NETO, 2001, KUTLER et al., 2003a). O defeito básico está relacionado com o reparo no dano do DNA, particularmente nos chamados DNA *cross linkers* (DIGWEED, 1999).

A Anemia de Fanconi é uma aplasia medular de origem hereditária que pode ser totalmente corrigida pelo transplante de medula óssea (TMO). No entanto, o risco em desenvolver neoplasias aumenta progressivamente após o TMO, principalmente o carcinoma espinocelular (CEC) na região de cabeça e pescoço (PASQUINI et al., 2003).

A identificação precoce de lesões orais malignas é fundamental e de grande influencia no prognóstico. A utilização de técnicas citológicas nos esfregaços da mucosa oral tem sido estabelecida permitindo o diagnóstico precoce (PEKTAS et al., 2006). A citologia esfoliativa é uma ferramenta útil na triagem inicial de pacientes de

alto risco, com suspeita de lesões malignas, bem como no controle e na detecção das recorrências de lesões (RAMAESH et al., 1999a; REMMERBACH et al., 2001).

Uma das modalidades da citologia esfoliativa é a utilização desta em base líquida, que consiste na avaliação de amostras de escovados bucais submersos em solução fixadora e armazenados em frascos até o processamento das lâminas e análise das mesmas em laboratório. A técnica não é agressiva e por isso bem aceita pelos pacientes, além de muito útil no diagnóstico de atipias celulares e do CEC (FREITAS et al., 2004). Este método permite melhor qualidade das preparações citológicas e análise do material remanescente através de outras técnicas, como imunohistoquímica, morfometria e biologia molecular (NAVONE et al., 2007). A morfologia é de considerável importância na diferenciação de células normais e anormais. No entanto, técnicas quantitativas, como a morfometria, têm sido utilizadas em citopatologia com o intuito de melhorar a acurácia diagnóstica (MOLLAOGLU; COWPE; WALKER, 2001; RAMAESH et al., 1999a). A utilização de mensurações das áreas do núcleo e citoplasma associadas à avaliação do DNA melhoram a sensibilidade diagnóstica (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988).

A ação do papilomavírus humano (HPV) na carcinogênese de tumores de cabeça e pescoço tem sido amplamente investigada. Este vírus tem participação substancial na carcinogênese de tumores em orofaringe e secundariamente na cavidade oral. O HPV-16, classificado como alto risco para transformação maligna é o genótipo mais frequente na grande maioria dos tumores de cabeça e pescoço, assim como daqueles na região cervical (HERRERO et al., 2003). A detecção do HPV em células esfoliadas da boca está associada a um aumento em três vezes no risco de tumores de orofaringe e da boca. E, a probabilidade de detecção do HPV em lesões cancerizáveis é 2 a 3 vezes maior do que na mucosa oral normal e nos CECs é 4.7 vezes (HERRERO et al., 2003; MILLER; JOHNSTONE, 2001).

O presente estudo pretende avaliar a morfologia e a morfometria das células epiteliais da mucosa oral coletadas por meio da citologia em base líquida em pacientes com Anemia de Fanconi em acompanhamento clínico e transplantados de medula óssea. Investigar a prevalência do HPV em células da mucosa oral, bem como identificar os genótipos presentes através de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização reversa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA DE FANCONI

A AF é dividida fisiopatologicamente em grupos de complementação. Até o momento 12 grupos já foram identificados, sendo caracterizados por A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L e M. Destes, 11 genes responsáveis foram clonados. O FA-A é o grupo de complementação mais comum, correspondendo a 65% dos casos (TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006). Dez dos genes envolvidos são de herança autossômica recessiva, enquanto que apenas o FANCB é recessivo ligado ao cromossomo X (MEETEI et al., 2004).

A mutação, deleção no exon 38 do gene FANCA (3788-3790del), é especialmente comum em pacientes com AF brasileiros. A identificação das características genéticas e clínicas de populações de AF permite aprofundar o conhecimento das correlações genotípicas-fenotípicas e com isto formas de tratamento melhores poderão ser instituídas, o que implica em um prognóstico melhor aos pacientes (MAGDALENA et al., 2005).

Os pacientes com AF apresentam insuficiência da medula óssea, anormalidades de desenvolvimento e malformações congênitas (PASQUINI; NETO, 2001). O número de células sangüíneas presentes ao nascimento é normal. A pancitopenia é progressiva e inicia-se freqüentemente entre os 5 e 10 anos de idade, podendo se manifestar por anemia ou leucopenia ou anemia e trombocitopenia (ALTAY et al., 1997).

As alterações congênitas mais comuns são: hiperpigmentações, manchas café com leite e hipopigmentações na pele; malformações cardíacas e renais; defeitos esqueléticos tais como: ausência do radio e do polegar, microcefalia, baixo desenvolvimento, anormalidades da face ou mandibular, microftalmia, microstomia, estrabismo, retardo mental, surdez e pregas de epicanto (PASQUINI; NETO, 2001; ALTER, 2007).

Em geral a doença pode evoluir para anemia aplástica grave em decorrência da falência progressiva da medula óssea, neoplasias malignas, principalmente a

leucemia mieloide aguda (LMA), tumores de fígado e CEC (OLIVEIRA; HAUFF, 1996; PASQUINI; NETO, 2001).

As aberrações cromossômicas, o aumento da suscetibilidade a agentes mutagênicos, os defeitos no reparo do DNA e as transformações virais específicas, têm sido citados como prováveis causas das neoplasias nos pacientes com AF (SCHOFIELD; WORTH, 1980).

Há três mecanismos que podem predispor os indivíduos com AF ao desenvolvimento de neoplasias: o defeito no reparo do DNA, o defeito na detoxificação de radicais de oxigênio e a imunodeficiência. As células dos pacientes apresentam aumentada sensibilidade a mutágenos como irradiação e agentes alquilantes, assim como maior suscetibilidade à transformação pelo vírus SV40. A imunodeficiência pode atuar tanto como uma consequência primária da doença, como uma complicação da terapia imunossupressiva pós-TMO (PASQUINI et al., 2003).

Os dois principais defeitos que participam no desenvolvimento de neoplasias malignas nos pacientes com AF são a instabilidade cromossômica e imunodeficiência (KAPLAN et al., 1985). O risco em desenvolver um CEC é quatro vezes maior em pacientes com AF que realizam TMO e ocorre mais precocemente do que em pacientes não transplantados (ROSENBERG et al.; 2005). A média de idade dos pacientes com AF que desenvolvem tumores em região de cabeça e pescoço é de 31 anos, enquanto que na população em geral é de 45 anos (KUTLER et al., 2003a). Além do risco em desenvolver CEC há um aumento na incidência desses tumores na região de cabeça e pescoço (OKSUZOGLU; YALÇUN, 2002).

O estudo realizado por KUTLER et al. (2003a) avaliou 754 pacientes quanto à ocorrência de neoplasias. Foram identificados 3% de CEC na região de cabeça e pescoço. A média de acompanhamento sem o desenvolvimento da neoplasia foi de 10,6 anos. Em 68% dos casos, a boca representou o sítio primário, seguida pela laringe em 11%, orofaringe em 11%, hipofaringe em 5% e local desconhecido em 5% dos casos. Na boca, a língua foi o sítio mais freqüente seguida pelo rebordo alveolar, trígono retromolar, assoalho da boca e mucosa oral. O estudo considerou que os pacientes com fenótipo agressivo, sem falência medular ou leucemia e sobreviventes após a terceira década de vida são de elevado risco para o desenvolvimento de CEC na região de cabeça e pescoço.

Uma hipótese interessante para justificar a predisposição a múltiplos CEC é um possível aumento na suscetibilidade das mucosas oral e anogenital a fatores predisponentes, como vírus e toxinas. A ligação dos vírus às mucosas deve-se ao fato de estas serem rotas comuns para infecções virais oncogênicas, especialmente o HPV e o herpes vírus humano (HHV). Cinquenta e quatro por cento dos pacientes com AF que desenvolveram CEC cervical, vulvar e anal apresentaram lesões condilomatosas associadas ao HPV previamente ao desenvolvimento da neoplasia. A imunossupressão associada à persistente falência medular e à instabilidade genética podem predispor o paciente a infecções virais e possivelmente à incorporação do DNA viral ao genoma da célula (KUTLER et al., 2003b).

Tumores sólidos são comuns em pacientes transplantados de medula óssea para Anemia Aplástica e AF e podem estar associados a infecções virais. Sequências de DNA do HHV 8, do vírus Epstein-Barr (EBV), vírus Varicela-Zoster (VZV), adenovírus e HPV foram avaliadas em áreas de CEC em 8 pacientes. Dentre os tumores avaliados, 5 localizavam-se na região de cabeça e pescoço, uma lesão disceratótica na língua e 2 carcinomas basocelulares na pele. Foram encontrados: HHV 8, EBV e HPV. A expressão da p53 foi avaliada para verificar o acúmulo deste gene supressor de tumor. Concluiu-se que a predisposição genética da AF e os fatores relacionados ao TMO, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a irradiação, exercem influência, mas a ocorrência de CEC nestes pacientes é um processo de múltiplos passos, nos quais a p53 e a presença de vírus oncogênicos têm papel importante (SOCIÉ et al., 1998).

Dada a instabilidade genômica inerente às células na AF é altamente provável que agentes ambientais como a exposição solar, o fumo e agentes virais sejam importantes fatores de risco adicionais no desenvolvimento de neoplasias malignas, embora seja difícil quantificá-los (DOKAL, 2008).

Recentes evidências clínico - patológicas levantaram a possibilidade de fatores ambientais também estarem envolvidos na patogênese do CEC em pacientes com AF, tais como o HPV. Esta suspeita deve-se à alta prevalência de mutações na p53 em pacientes com CEC não portadores de AF e ausência desta nos pacientes com AF. A AF está associada a um aumento na suscetibilidade da carcinogênese induzida pelo HPV. Este vírus foi detectado em 84% dos casos de CEC em pacientes com AF e 36% em um grupo controle de pacientes com CEC não

portadores da doença. O HPV-16 foi o tipo mais freqüente em ambos os grupos. A PCR em tempo real confirmou a presença dos HPVs-16 e 18 e o número médio de cópias do vírus por genoma encontrado foi de 2,6 (variando de 0,16 a 249,3 cópias/genoma) e 3,2 (0,15 a 190,85 cópias/genoma) em pacientes com AF e controle, respectivamente. Altos índices de CEC anogenitais e em região de cabeça e pescoço entre os pacientes com AF podem estar associados à alta freqüência de HPV oncogênicos encontrados nos tecidos tumorais. No entanto, ainda não está claro se a elevada prevalência de HPV encontrada nos casos de CEC é devida à uma possível disfunção imune na AF ou se está diretamente associada ao mecanismo de defeito da AF (KUTLER et al., 2003c).

Uma série de 5 CEC e linhagens celulares tumorais em região de cabeça e pescoço em pacientes com AF foi analisada através de PCR semi-quantitativa para o HPV. O DNA-HPV não foi encontrado em nenhum dos CECs. No entanto, todos apresentaram mutação da p53. Foi sugerido que o HPV não estava envolvido na gênese dos tumores avaliados. Os experimentos empregaram técnicas sensíveis e utilizaram sondas específicas para os HPVs mais comumente envolvidos na carcinogênese oral, como o HPV-16. Baixas quantidades do vírus poderiam ser identificadas pelos métodos utilizados no estudo, como uma cópia do HPV em 5.000 células (VAN ZEEBURG et al., 2004; VAN ZEEBURG et al., 2005).

O mecanismo da AF pode ser alterado como uma resposta precoce às infecções pelo HPV de alto risco, explicando a suscetibilidade aumentada nos pacientes com AF para o desenvolvimento de CEC em sítios anatômicos freqüentemente infectados por este vírus. A oncoproteína E7 do HPV pode ativar o mecanismo de defeito do DNA na AF e causar uma aceleração da quebra cromossômica. A oncoproteína E6 do HPV-16 contribui para a formação de tumores por inativar a proteína supressora de tumor p53. A integração do genoma viral à célula hospedeira também afeta o mecanismo de ativação da AF (SPARDY et al., 2007).

A identificação do HPV em pacientes com AF deve ser iniciada o mais cedo possível, lembrando que nestes pacientes a história natural de neoplasia tem curso precoce mesmo na ausência de agentes carcinogênicos como álcool e fumo. O aumento da suscetibilidade em desenvolver CEC nos pacientes com AF freqüentemente em locais que comumente apresentam infecção pelo HPV, e o

porquê do desenvolvimento em uma idade mais precoce que a população em geral, ainda são incertos (LOWY; GILLISON, 2003).

2.1.1 Diagnóstico da AF

O diagnóstico da AF pode ser clínico, genético, hematológico e molecular.

O diagnóstico clínico baseia-se fundamentalmente na história familiar, na consangüinidade, nas manifestações clínicas e é confirmado pelas alterações citogenéticas espontâneas ou induzidas pelos agentes clastogênicos (PASQUINI; NETO, 2001).

O teste genético laboratorial de diagnóstico é o cariótipo que utiliza preparações metafásicas de linfócitos de cultura de sangue periférico estimulado por fitohemaglutinina. As células na AF apresentam quebras, rearranjos, trocas e endorreduplicações. A freqüência das quebras está elevada em culturas basais (sem estimulação), porém há um aumento dramático se comparado com o normal, quando são adicionados agentes clastogênicos, como o DEB, a MMC e a mostarda nitrogenada. O teste DEB é altamente sensível e específico para AF (D'ANDREA; GROMPE, 1997; DOKAL, 2000).

O diagnóstico hematológico prevê a realização de um hemograma e aspirado da medula óssea. O hemograma dos pacientes com AF demonstra trombocitopenia ou leucopenia antes do desenvolvimento da pancitopenia, que é progressivamente mais grave. O esfregaço do sangue periférico mostra uma redução do número de plaquetas e leucócitos (PASQUINI; NETO, 2001).

A avaliação molecular na AF para se determinar o gene afetado compreende a realização de estudos de fusão de células normais com células de pacientes com AF em que se conhece o gene mutado. Quando as células de AF se fusionam com as de um indivíduo não afetado, desaparece a instabilidade cromossômica das células de AF pela função aportada pelos genes homólogos das células sãs (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras síndromes de instabilidade cromossômica, com enfermidades ou síndromes com características clínicas semelhantes e com enfermidades hematológicas (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003). Dentre estas, as principais síndromes hereditárias que causam falência medular são: disceratose congênita, anemia Diamond-Blackfan, síndrome Shwachman-Diamond, neutropenia severa congênita, trombocitopenia com ausência de radio (ALTER, 2007).

2.1.2 Manifestações orais

Dentre as alterações orais associadas à AF, o sangramento gengival espontâneo e a doença periodontal progressiva são geralmente sinais inicialmente vistos. Um caso de uma paciente com CEC de língua com evolução de 6 a 8 meses foi relatado (SCHOFIELD; WORTH, 1980).

Os pacientes portadores de AF são mais suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias como o CEC na região de cabeça e pescoço e anogenital. Na boca, o local de maior prevalência é a língua (KENNEDY; HART, 1982).

MILLEN et al. (1997) relataram um caso de CEC em uma paciente jovem 9 anos após o TMO alogênico. Enfatizaram que além da predisposição genética característica da doença, a terapia pré-transplante com ciclofosfamida, o regime de condicionamento com irradiação tóraco-abdominal, a DECH crônica e a prolongada terapia imunossupressiva foram fatores de risco importantes.

JANSISYANONT, PAZOKI e ORD (2000) relataram o caso de uma paciente jovem com lesão de língua diagnosticada como CEC, que em biópsias anteriores, apresentava-se como alterações epiteliais benignas do tipo hiperkeratose, acantose e parakeratose.

As manifestações orais na AF incluem a microdontia generalizada, o CEC e a periodontite avançada (NOWZARI et al., 2001)

A transformação maligna nas áreas mucosas e mucocutâneas, especialmente o CEC oral e urogenital, têm sido demonstrada na AF. O CEC ocorre em pacientes com disfunção medular leve, pois estes são os que sobrevivem por algumas décadas, o suficiente para o desenvolvimento da neoplasia. A média de idade de diagnóstico do CEC é aos 26 anos. Os locais mais acometidos são a boca, a região anogenital e o esôfago. Há um aumento da incidência de malignidades após o TMO (OKSUZOGLU; YALÇUN, 2002).

PASQUINI et al. (2003) relataram casos de 3 pacientes que desenvolveram CEC de língua após o TMO. Demonstraram que, ao longo do tempo de evolução pós-TMO, o risco de malignidade linfóide decai rapidamente, enquanto o risco para tumores sólidos aumenta progressivamente.

Periodontite agressiva, dentes supranumerários ou ausência congênita de dentes são alterações orais comuns na AF. A tendência aumentada em desenvolver doença periodontal pode ser explicada pela anemia, leucopenia, defeito na detoxificação de radicais de oxigênio, que são característicos da doença, mas também pelo tratamento medicamentoso empregado para corrigir a imunossupressão, como o uso da prednisona (AÇIKGÖZ et al., 2005).

ZHANG et al. (2002) relataram 3 casos de CEC oral após o TMO para distúrbios diferentes, nos mesmos sítios anatômicos, previamente haviam apresentado DECH crônica, caracterizada por mucosite liquenóide.

Os CEC na AF podem eventualmente acometer regiões anatômicas infreqüentemente vistas em pacientes não portadores da doença, como um caso relatado em palato duro. O paciente não havia realizado TMO, apresentava pancitopenia moderada e realizava terapia androgênica. O tratamento de escolha para os CEC na AF é exérese total da lesão. E, apesar da condição hematológica os pacientes com AF suportam adequadamente os procedimentos cirúrgicos. Complicações pós-operatórias como hematoma e infecções poderiam ser preocupações comuns nestes pacientes, pela condição de imunossupressão; no entanto, não são relatadas (GASPARINI et al., 2006).

As manifestações orais mais freqüentes nos pacientes com AF são: sangramento gengival, gengivite, periodontite, pigmentação melânica, lesões traumáticas e língua saburrosa. As lesões traumáticas e o sangramento gengival são

associados à condição hematológica, isto é, ao quadro anêmico dos pacientes, enquanto que as alterações periodontais, gengivite e periodontite, não estão correlacionadas à condição hematológica, e sim à higiene oral inadequada (ARAUJO et al., 2007).

As principais manifestações orais da AF são microdontia generalizada, dente supranumerário, transposição dentária, ausência dentária congênita, gengivite, língua saburrosa e atrofia papilar (TEKCICEK et al., 2007).

Um caso de CEC em língua em uma paciente de 13 anos de idade foi diagnosticado 2 anos após a realização do TMO. Testes para o DNA-HPV no tumor foram negativos. O tratamento apropriado para os casos de CECs orais em pacientes com AF é a remoção cirúrgica radical, já que a quimio e radioterapia são controversas pela baixa tolerância dos pacientes devido o defeito no reparo do DNA (REINHARD et al., 2007).

2.1.3 Tratamento

As vias de tratamento consistem em basicamente quatro categorias: terapia androgênica, fatores de crescimento sintéticos, transplante de medula óssea (TMO) e terapia gênica (NOWZARI et al., 2001).

O tratamento de suporte e hormonal (transfusões e hormônios androgênicos) tem caráter paliativo. Se necessário, realizam-se intervenções cirúrgicas em más formações possíveis de correção. O tratamento de suporte também consiste no controle de complicações infecciosas (PASQUINI; NETO, 2001).

A pancitopenia pode apresentar melhora com o uso de andrógenos. No entanto, podem ocorrer efeitos adversos como a incidência de tumores hepáticos e a influência negativa na sobrevida após o TMO (PASQUINI; NETO, 2001).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos têm sido utilizados para estimular a produção de células que são vitais para o sistema sangüíneo (SANTOS; GAVISH; BUCHWALD, 1994). Há 3 tipos: o G-CSF (Fator estimulante de colônias

granulocíticas), o GM-CSF (Fator estimulante de colônias grânulo-monocíticas) e a EPO (Eritropoetina), estimulante da série vermelha (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003).

A terapia gênica, na qual se realiza a correção da mutação pela inserção gênica parece ser um método promissor. Embora não seja a realidade, geneticistas têm estudado a introdução de genes saudáveis no paciente na localização celular correta. Futuramente será possível fazer um transplante autólogo de medula óssea que tiver sido corrigida *in vitro* (SANTOS; GAVISH; BUCHWALD, 1994).

O TMO é a melhor alternativa terapêutica e pode corrigir problemas relacionados com a anemia, neutropenia, mielodisplasia, trombocitopenia ou leucemia (D'ANDREA; GROMPE, 1997). É o único tratamento que oferece possibilidade de cura hematológica, capaz de restaurar a hemopoese normal e prevenir ou curar a leucemia (ROSENBERG et al., 2005). A sobrevida dos pacientes submetidos ao TMO é de 70% (D'ANDREA; GROMPE, 1997; PASQUINI; NETO, 2001). A DECH aguda tratada com globulina antitimocítica, anti-CD3 monoclonal ou com irradiação corpórea total é fator de risco para o desenvolvimento de tumores secundários. Apesar da predisposição genética, a terapia imunossupressiva pode levar a um aumento na incidência de neoplasias malignas secundárias nos pacientes transplantados para AF. O TMO não previne o desenvolvimento de neoplasias e a imunossupressão prolongada pode ser um fator de risco adicional. A aplasia medular é curada com o TMO, mas paradoxalmente aumenta a incidência de tumores secundários, desde que a sobrevida do paciente seja suficiente para o desenvolvimento destes (SOCIÉ et al., 1998).

O TMO contribui para um aumento na incidência de neoplasias malignas. Nestes pacientes há ainda 4 fatores adicionais: a irradiação corpórea total, o tratamento com ciclofosfamida, a DECH crônica e a terapia imunossupressiva após o transplante (SOCIÉ et al., 1998).

A DECH aguda e crônica demonstraram uma associação significativa com o desenvolvimento de CEC (aumento do risco em 33 vezes) em pacientes transplantados para AF. Especificamente para o CEC em cabeça e pescoço, o regime de condicionamento com radiação ou ciclofosfamida prévio ao TMO não aumentaram o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas (ALTER, 2005).

Pacientes com AF não transplantados de medula óssea apresentam um risco 30 vezes em desenvolver CEC, enquanto que em pacientes transplantados o risco é 66 vezes maior do que na população geral (ROSENBERG et al., 2005).

A média de idade de desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço é de 26 anos em pacientes com AF que não realizaram o TMO, e 21 anos de idade em pacientes que o realizaram. O intervalo entre o TMO e o desenvolvimento de neoplasia maligna varia de 2 a 15 anos (ALTER, 2005).

A partir dos anos 80, a sobrevida dos pacientes que receberam transplante de medula óssea vem aumentando. Conseqüentemente, a importância dos efeitos tardios relacionados ao transplante de medula óssea vem ganhando destaque, principalmente em pacientes pediátricos (ANELLI, 2005). Os efeitos tardios normalmente ocorrem a partir do segundo ano pós-TMO, destacando-se a DECH crônica, neoplasias secundárias e infecções (FERRY; SOCIÉ, 2003).

Os pacientes com sobrevida maior após o TMO são de alto risco para desenvolver complicações oculares, endócrinas, gastrointestinais, musculoesqueléticas, neurossensoriais, neuromotoras e orais (BAKER et al., 2004).

A DECH aguda é caracterizada por lesões que ocorrem durante os primeiros 100 dias após o transplante, embora as manifestações clínicas e histológicas possam estar presentes antes disto. Esta alteração está associada a um índice elevado de mortalidade. A forma crônica da DECH se desenvolve após os 100 primeiros dias do TMO. Acometem principalmente a pele, os olhos, mucosas e eventualmente o fígado e os pulmões. O aspecto do paciente, em muito se assemelha ao da esclerodermia. Na pele as manifestações são eritema com máculas e placas, descamação, despigmentação, vitiligo, anormalidades nas unhas e alopecia, mais tardiamente, endurecimento, contraturas, atrofia e dermatose difusa ou localizada (RIUL; AGUILLAR, 1996; OLIVEIRA, 1988; DE LA ROSA-GARCÍA; BOLOGNA-MOLINA; VEGA-GONZÁLEZ, 2006). O tratamento da DECH com ciclosporina, talidomida ou metotrexato é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas (KOLB et al., 1999).

A DECH aguda e crônica são fatores de risco significativamente associados ao desenvolvimento do CEC em pacientes pós-TMO para AF. Contudo, a base biológica que justifique esta associação ainda não é conhecida. A DECH aguda

aumenta em 33 vezes este risco. Foi relatado que em 11 pacientes que desenvolveram CEC todos apresentaram previamente DECH crônica. Estes pacientes eram mais jovens do que a média e o desenvolvimento do carcinoma ocorreu precocemente após o TMO (ROSENBERG et al., 2005).

A utilização de terapias prévias como agentes citotóxicos, drogas imunossupressoras e radioterapia são condições que podem aumentar o risco de neoplasias secundárias. Vários estudos observaram aumento significativo nas incidências de linfoma não Hodgkin, leucemia, glioblastoma multiforme e carcinoma hepatocelular em pacientes pós-TMO (ANELLI, 2005; RIUL; AGUILLAR, 1996).

A presença de HPVs de alto risco (HPV-16 e 18) em CEC orais que se desenvolveram após a DECH em pacientes transplantados para causas diversas foi demonstrada (BYUN et al., 2008).

2.2 ANEMIA APLÁSTICA SEVERA

A anemia aplástica severa (AAS) é uma doença hematológica imuno-mediada rara, de elevada letalidade caracterizada por pancitopenia periférica e hipoplasia medular. A AAS pode ser encontrada nas diversas regiões no mundo. No entanto estudos populacionais demonstraram que a doença é mais comum no oriente do que no ocidente (YOUNG, 2002; SEPÚLVEDA et al., 2006).

A AAS é definida quando pelo menos dois de três critérios estão presentes: contagem de neutrófilos menor que $0,5 \times 10^9$ células/litro (500 células/mm³), contagem plaquetária menor que 20×10^9 células/litro (20.000 células/mm³) e contagem de reticulócitos menor que 1%. Quando a contagem de reticulócitos é menor que $0,2 \times 10^9$ células/litro (200 células/mm³) a doença é caracterizada como muito severa (YOUNG, 2002).

Estudos epidemiológicos e laboratoriais envolvendo a identificação laboratorial de antígenos foram realizados. No entanto, ambos não apresentaram resultados conclusivos quanto à etiologia da AAS. Algumas evidências mostram que esta desordem pode ser de etiologia hereditária, idiopática ou adquirida. Vários

agentes causais têm sido implicados no seu desenvolvimento, como agentes químicos, físicos e infecciosos. Os derivados do benzeno são agentes químicos que podem causar depressão medular. Os inseticidas, anticonvulsivantes, antiinflamatórios, antimaláricos, cloranfenicol e metais pesados são drogas possivelmente relacionados com a aplasia medular (YOUNG; CALADO; SCHEINENBERG, 2006).

Para a AAS as terapias definitivas são a imunossupressão ou o TMO. A terapia de imunossupressão é amplamente utilizada pela falta de histocompatibilidade e dificuldade em encontrar doadores compatíveis, além dos elevados custos do transplante. A maioria dos especialistas utiliza a globulina antitimocítica (ATG) em combinação com a ciclosporina e obtém resultados muito satisfatórios (YOUNG; CALADO; SCHEINENBERG, 2006).

A taxa de fatalidade da AAS é alta embora as modalidades de tratamento, TMO e a terapia imunossupressiva, tenham apresentado uma grande melhora nos últimos 25 anos, o que contribuiu para um aumento na sobrevida em mais de 75% dos pacientes (MONTANÉ et al., 2008).

Os pacientes em tratamento para AAS apresentam um risco em desenvolver neoplasias de 5,15% após terapia imunossupressiva, e 6,67% após o TMO. A incidência acumulativa para o desenvolvimento de neoplasias após 10 anos é de 18,8% e 3,1%, após terapia imunossupressiva e TMO, respectivamente. O desenvolvimento de tumores sólidos ocorre em média em 54 meses, principalmente na região de cabeça e pescoço. Pacientes com AAS que apresentam uma sobrevida maior são de alto risco para subseqüentes lesões malignas. A síndrome mielodisplásica e a LMA tendem a ocorrer após a terapia imunossupressiva, enquanto que a incidência de tumores sólidos aumenta em pacientes que realizam TMO (SOCIÉ et al., 1993).

Uma análise de 700 pacientes transplantados para AF e AAS mostrou que o risco de desenvolvimento de uma neoplasia é nove vezes maior após o TMO. O condicionamento prévio ao transplante com radiação ionizante, a DECH e seu tratamento com azatioprina que causa imunossupressão, e a terapia de controle pós-TMO apresentam grande influência no desenvolvimento de tumores sólidos nestes pacientes (DEEG et al., 1996).

Além dos fatores acima citados o risco elevado para a transformação maligna também pode ser atribuído a uma deficiência imune devido ao retardo e incompleta recuperação deste sistema após o TMO (KOLB et al., 1999).

A boca é um sítio comum para a ocorrência de complicações na AAS. Desta forma, o diagnóstico precoce e tratamento de lesões orais são importantes para diminuir riscos de morbidade e mortalidade nesses pacientes. A neutropenia, causada pela doença leva a um aumento da suscetibilidade de infecção e a trombocitopenia contribui para o sangramento da mucosa oral. Ambas as complicações são correlatas à sepsis e hemorragia, que são as principais causas de morte (SEPÚLVEDA et al., 2006).

As manifestações orais presentes na AAS estão principalmente relacionadas com a imunossupressão. Os pacientes podem apresentar petéquias, hiperplasia gengival, sangramento gengival espontâneo, ulcerações herpéticas, candidose e palidez. As infecções fúngicas e bacterianas são causas de sepsis comuns (BRENNAN et al., 2001).

Sangramentos gengivais, lesões hemorrágicas, candidíase, e infecções virais causadas pelo HHV, VZV e herpangina, são manifestações orais freqüentes em pacientes com AAS (SEPÚLVEDA et al., 2006).

2.3 CITOLOGIA ESFOLIATIVA

A Citologia oral é definida como o estudo, interpretação e caracterização de células descamadas da superfície da mucosa oral. Consiste em observar ao microscópio a morfologia das células epiteliais superficiais depois de fixadas e coradas. As células podem ser destacadas da mucosa naturalmente como em amostras obtidas em bochechos, ou artificialmente como em amostras obtidas de raspados com espátula (FREITAS et al., 2004).

A citologia é um exame amplamente utilizado, principalmente na ginecologia para a identificação de displasias e neoplasias cervicais. Sua indicação na Odontologia inclui várias técnicas para a avaliação das células esfoliadas da boca.

Estas técnicas de esfoliação têm vantagem sobre biopsias convencionais por não necessitarem de procedimento invasivo (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002; FREITAS et al., 2004). O procedimento não é agressivo e por isso bem aceito pelos pacientes, além de muito útil no diagnóstico de atipias celulares e do CEC. Porém, há elevado número de resultados falsos negativos, que têm sido minimizados pelo desenvolvimento de métodos citomorfométricos, análise do DNA, métodos imunocitoquímicos para detecção de marcadores tumorais e diversas outras análises moleculares (FREITAS et al., 2004).

A citologia esfoliativa é um método de fácil execução, barato, não invasivo, seguro, indolor e preciso na detecção de lesões cancerizáveis da mucosa oral, carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos (REMMERBACH et al., 2001).

O exame citológico da boca pode ser dificultado pelos inúmeros raspados que devem ser realizados nos diferentes sítios anatômicos ou áreas visualizadas pela inspeção para se obter material que reproduza suficientemente as condições dos tecidos orais (CARVALHO, 2002).

As neoplasias malignas epiteliais da boca são precedidas por um carcinoma *in situ*, que em dois terços dos casos não apresenta sinais clínicos característicos, mas podem ser identificados pela citologia (PEREZ; LÓPEZ; NAVARRO, 2002). Para estes autores, a citologia tem eficiência global de 96% quando comparada à biopsia convencional.

NAVONE et al. (2004) realizaram estudo comparativo entre a biopsia convencional e a citologia esfoliativa, observando que esta tem uma especificidade de 94,3% e precisão de 89,6%. Com estes dados, os autores afirmam que a citologia é um método útil no diagnóstico de displasias e neoplasias malignas orais.

RAMAESH et al. (1998) realizaram diagnóstico histopatológico e citológico de leucoplasias e CEC da mucosa oral. Após a comparação dos resultados mostraram que a precisão da citologia é de 92% e 95% para a leucoplasia e para o CEC respectivamente, enquanto que a especificidade é de 100% para ambos. Demonstraram que a citologia é um método eficaz no diagnóstico de lesões com potencial de malignização e lesões malignas da boca.

A citologia tem se mostrado um exame de grande sensibilidade e especificidade; no entanto, pouco utilizada na Odontologia. Provavelmente, a pouca

popularidade da citologia oral deve-se à dificuldade em obter amostras satisfatórias e adequadas para a análise, mesmo quando profissionais experientes a utilizam (NAVONE et al., 2007).

JOSEPH (2002) acrescenta que a citologia oral deve ser utilizada em grupos de pacientes que apresentem alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas como método de controle. O diagnóstico precoce dos carcinomas orais aumenta a probabilidade de cura, melhora prognóstico e implica numa menor morbidade do paciente.

As principais indicações da citologia esfoliativa oral são:

- revisão periódica em pacientes de alto risco;
- revisão periódica de lesões orais cancerizáveis;
- interpretação de áreas anormais sem indicação clara de biópsia, nas quais apenas o exame clínico não seria suficiente para o diagnóstico;
- programa de prevenção de câncer de boca;
- controle de pacientes submetidos à tratamento cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico para lesões malignas (KAUGARS et al., 1998; BIRMAN; SUGAYA, 1999).

2.3.1 Características celulares e classes citopatológicas

As alterações celulares mais importantes observadas nas citologias esfoliativas são: anisocitose, vacuolização, propriedade alterada dos corantes, inclusões citoplasmáticas e polimorfismo. Dentre as alterações nucleares destacaram: hipercromatismo, hipo ou policromia, irregularidades da membrana, multinucleação, figuras mitóticas aberrantes e alterações degenerativas (BIRMAN; SUGAYA, 1999).

As lesões malignas intra-orais são caracterizadas por: aumento nuclear, variação no tamanho e forma do núcleo, aumento da razão núcleo:citoplasma, nucléolos múltiplos e predominantes, hipercromatismo, anormalidade na cromatina e

distribuição e discrepância na maturação das células (SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958).

Os esfregaços de lesões cancerizáveis e carcinomas orais apresentam as seguintes características: aumento da ceratinização, aumento da área nuclear, alteração da relação núcleo:citoplasma, hiperchromatismo nuclear, pleomorfismo celular, agrupamento da cromatina e irregularidade na distribuição desta (SUGERMAN; SAVAGE, 1996; REMMERBACH et al., 2001).

2.3.2 Citologia em base líquida

A citologia em base líquida foi desenvolvida para melhorar a coleta de amostras, bem como a avaliação das lâminas. Nesta técnica as células são primeiramente suspensas na solução fixadora, o que permite obter uma camada de células mais fina e representativa. Há uma melhora na sensibilidade e na especificidade do diagnóstico (BROADSTOCK, 2001; LINDER, 1997).

Nas preparações em base líquida a amostra coletada é submersa em um líquido de preservação permitindo a fixação imediata da células. Esta técnica resulta em lâminas de alta celularidade dispersas em uma camada homogênea. Sangue, inflamação e muco são reduzidos e distribuídos aleatoriamente pela lâmina. O fundo claro aumenta a sensibilidade e qualidade (LINDER, 1997; NASUTI; TAM; GUPTA, 2001).

Excelentes sensibilidade e especificidade (95% e 99%) são relatadas no emprego da citologia em base líquida, enquanto que a citologia convencional é menos específica e sensível (85,7% e 95,9%, respectivamente) (NAVONE et al., 2007)

Os métodos de citologia em base líquida disponíveis mais comumente utilizados são: o ThinPrep® (Cytoc Corporation), o Autocyte® (Medical Solutions) e o Sistema Digene® (KAHN, 2001; SISTEMA DNA-CITOLIQU, 2002).

A citologia em meio líquido reduz os principais erros metodológicos relacionados à citologia esfoliativa convencional, como: falta de representatividade

celular no esfregaço causado por coleta pobre e/ou inadequada; artefatos ou distorções morfológicas pela má-fixação; distribuição aleatória das células no esfregaço; presença de aglomerados celulares; grande quantidade de células sangüíneas e debris que podem obscurecer o esfregaço; células importantes na avaliação da malignidade que podem não ter sido transferidas para a lâmina e assim permanecendo no instrumento de coleta (MERLIN, 2002).

CAMPAGNOLI (2003) realizou um estudo com 19 pacientes que apresentavam carcinoma oral com diagnóstico confirmado por exame histopatológico, comparando a citologia esfoliativa convencional e a citologia em base líquida. O autor afirmou que a citologia em base líquida reduziu o número de amostras insatisfatórias e aumentou a sensibilidade do teste, visto que as lâminas são de melhor qualidade. A interpretação e leitura das lâminas são facilitadas pela menor quantidades de debris, células inflamatórias e hemácias; há um maior número de células epiteliais das diversas camadas uniformemente distribuídas; e mostrou ser de grande confiabilidade, principalmente nos casos de neoplasias malignas de origem epitelial.

A citologia em base líquida permite uma melhor avaliação da morfologia das células epiteliais orais, visto que estas se apresentam mais dispersas e de forma mais clara quando comparada com a citologia convencional. Este método permite ainda a preparação de mais de uma lâmina por amostra coletada, havendo portanto a possibilidade de o material a ser corado por outros métodos como PAS (ácido periódico de Schiff) ou metamina de prata, se houver necessidade. Outra grande vantagem é que a solução fixadora permite um armazenamento por período prolongado. Há uma importante concordância nos diagnósticos obtidos com ambos os métodos (HAYAMA et al., 2005)

No entanto, algumas limitações são citadas em relação à citologia, seja convencional ou em base líquida, como a visualização apenas de células isoladas, sem as alterações arquiteturais, o que aumenta a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos; somente células epiteliais são obtidas e mudanças celulares patológicas podem não estar presentes em células mais superficiais; as células não podem ser estudadas em relação ao tecido, como na análise histopatológica. Algumas limitações podem ser justificadas principalmente por erros na execução técnica; por esfregaços muito espessos originando sobreposição

celular significativa e pela grande quantidade de células sangüíneas e debris (KAHN, 2001).

Algumas análises têm sido associadas à avaliação citológica com o intuito de superar as limitações do exame, como a estereologia (análise seccional) e análises computacionais representadas por técnicas quantitativas como a citomorfometria (COWPE, 1984; MOLLAOGLU; COWPE; WALKER, 2001). A morfologia descritiva é de considerável importância na diferenciação das células normais e anormais. E a morfometria aumenta a acurácia e sensibilidade diagnóstica de lesões cancerizáveis (RAMAESH et al., 1999a). A utilização de mensurações das áreas do núcleo (NA) e do citoplasma (CA) e a avaliação do DNA tem mostrado uma grande melhoria na sensibilidade da citologia oral (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988). A avaliação citomorfométrica pode prover informações adicionais no diagnóstico de lesões malignas e deve ser considerada de grande importância no monitoramento de pacientes, permitindo a detecção destas lesões em um estágio precoce (COWPE; 1984, MOLLAOGLU; COWPE; WALKER, 2001). A utilização de redes neurais associadas à morfometria é importante ferramenta nos casos limítrofes no diagnóstico citológico, principalmente nos casos nos quais o emprego da média da NA e CA sozinhos não permite a diferenciação de células malignas (CARANTU; SCUTARIU; DOBRESCU, 2005).

Alguns estudos demonstraram pela avaliação citomorfométrica que as células epiteliais de lesões malignas orais apresentam um aumento da NA e uma diminuição da CA (COWPE, 1984; COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988; MOLLAOGLU; COWPE; WALKER, 2001).

2.4 MANIFESTAÇÕES ORAIS E CITOLÓGICAS DAS ANEMIAS

Diversos autores relataram alterações nas células epiteliais orais em pacientes com diversos tipos de anemias. No entanto não há dados específicos na literatura ou relatos no que diz respeito a AAS e AF.

Algumas alterações nucleares observadas pela citologia são relatadas em casos de anemias, como cromatina em forma de barra, células binucleadas, núcleo

aumentado e ovóide, aumento da coloração da membrana celular. No entanto, estas alterações não são patognomônicas ou específicas dos diferentes tipos de anemias. Embora haja um aumento destas alterações nucleares em pacientes anêmicos quando comparado com indivíduos saudáveis estas podem sugerir alterações hematológicas e levantar suspeitas quanto a um quadro anêmico, mas não são capazes de concluir o diagnóstico. Este deve ser elaborado através de avaliações hematológicas (DIVERSI; GRIFFIN; PAYNE, 1966).

Avaliações citomorfométricas foram descritas em pacientes com anemia por deficiência de ferro, perniciosa e megaloblástica. Um aumento da área do núcleo das células epiteliais orais é observado em todos os tipos de anemia. As alterações no diâmetro do citoplasma são variáveis de acordo com o tipo de anemia e não são consenso entre os vários estudos, apresentando ora um aumento ora uma diminuição (GRAHAM; RHEAULT, 1954; BOEN, 1957; BODDINGTON, 1959; MONTO; RIZEK; FINE, 1961; RENNIE; MACDONALD; DAGG, 1984).

Um aumento do tamanho das células epiteliais orais observados pela citologia esfoliativa é relatado na anemia perniciosa (STAATS; ROBINSON; BUTTERWORTH, 1969). Nesta, há um grande aumento do diâmetro do citoplasma de células esfoliadas da boca, enquanto que na anemia por deficiência de ferro é reduzido (MONTO; RIZEK; FINE, 1961; GRAHAM; RHEAULT, 1954).

Uma redução do diâmetro do citoplasma, um paradoxal aumento do núcleo e conseqüentemente uma alteração da relação núcleo citoplasma foi observada pela citologia esfoliativa em pacientes com anemia por deficiência de ferro. Presença de núcleos duplos, cariorrexis e aumento dos nucléolos são alterações nucleares descritas (MONTO; RIZEK; FINE, 1961).

Pacientes com anemia por deficiência de ferro apresentam uma redução na espessura do epitélio oral, evidenciada principalmente pela atrofia da língua e perda das papilas filiformes. Estas alterações linguais são reversíveis após a terapia com ferro (RANASINGHE et al., 1983).

Um estudo em pacientes com anemia por deficiência de ferro de uma população da Índia mostrou um aumento da razão núcleo/citoplasma nas células epiteliais da camada intermediária (GURURAJ; SIVAPATHASUNDHARAM; SUMATHY, 2004).

Após a terapia específica para cada tipo de anemia a área do núcleo e do citoplasma retornam à normalidade (MONTÓ; RIZEK; FINE, 1961; GRAHAM; RHEAULT, 1954).

LU; WU (2004) realizaram um estudo envolvendo 30 pacientes com sintomas bucais que levaram ao diagnóstico de anemia por deficiência de ferro, anemia perniciosa, deficiência de vitamina B12 e ferro e anemia associada a doença crônica. Os pacientes foram submetidos à avaliação hematológica e anamnese detalhadas que levaram ao diagnóstico dos quadros anêmicos. Os autores observaram que os pacientes com anemia por deficiência de ferro apresentaram: glossite atrófica, úlcera oral recorrente, mucosa oral pálida, queilite angular, candidose oral, mucosite eritematosa, glossodínia e sensação de queimação na língua. Nos pacientes com anemia perniciosa os sintomas bucais encontrados foram: glossite atrófica, glossodínia, úlcera oral recorrente, queilite angular, candidose oral e mucosite eritematosa. Os sintomas mais frequentes em pacientes com anemia por deficiência de ferro e vitamina B12 foram: queilite angular, palidez da mucosa oral, candidose oral, mucosite eritematosa, queilite angular e glossite atrófica. Nos pacientes com anemia associadas a doenças crônicas foi observado: glossite atrófica, mucosite eritematosa e candidose oral. Os autores afirmaram que as anemias por doenças crônicas e por deficiências nutricionais devem ser suspeitadas nos casos de glossodínia, glossite, queilite angular, mucosite eritematosa, candidose oral, úlcera oral recorrente e queimação bucal quando nenhuma outra causa óbvia for encontrada. No diagnóstico diferencial fatores locais, sistêmicos, psicogênicos e complicações do uso de drogas devem ser considerados. Acrescentam que não é possível perceber as diferenças entre os sintomas orais de pacientes anêmicos e não anêmicos, clinicamente.

O exame físico do paciente por meio da avaliação da palidez palmar e plantar, das mucosas conjuntiva e oral tem sido utilizado com indicativo de quadros anêmicos. A avaliação destes sítios anatômicos é clinicamente vantajosa em detectar anemia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda, primariamente, a avaliação da palidez da pele e mucosas como um indicativo da presença de anemia, principalmente em países nos quais a prevalência é alta (YURDAKOK; GUNER; YALÇIN, 2008).

2.5 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O papilomavírus humano é um vírus de DNA circular de 8.000 pares de bases, não envelopado, de 52-55nm de diâmetro. As partículas virais consistem de uma única molécula de DNA de fita dupla. É um vírus epiteliotrófico que infecta a camada basal do tecido epitelial escamoso mucoso e cutâneo induzindo proliferação celular. Todos os HPVs dividem uma estrutura genética comum e apresentam um capsídeo icosaédrico não envelopado. A família do HPV é representada por mais de 100 genótipos classificados de acordo com o tipo de célula epitelial infectada e habilidade em alterá-las. Biologicamente, os HPVs são divididos em cutâneos e mucosos e quanto à transformação maligna em alto e baixo risco (IARC, 2007). Os tipos de baixo risco estão associados a lesões benignas como as verrugas vulgares, dentre eles: HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108. E os de alto risco a lesões malignas como os: HPVs 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (MUÑOZ et al., 2003; TROTTIER; FRANCO, 2006; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007; IARC, 2007). Vinte e quatro tipos de HPV já foram associados com lesões orais (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). O HPV 1 infecta predominantemente células epiteliais cutâneas, enquanto que os HPVs 6, 11, 16 e 18 infectam células epiteliais mucosas (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007).

O genoma do HPV compreende diversos genes precoces e tardios, bem como regiões não codificantes, de forma que todos participem na replicação viral, transcrição e carcinogênese. O alinhamento das seqüências de DNA do HPV revela uma organização genética de nove regiões que codificam proteínas virais “*open reading frames*” (ORF), todas transcritas em uma fita única de DNA. Estas regiões do genoma do HPV foram identificadas de acordo com sua função na replicação viral e podem ser divididas em três partes funcionais: uma região longa de controle (LCR) não codificante que compreende cerca de 10% do genoma, as regiões precoce (E) e tardia (L). São sete regiões ditas precoces, E1 a E7, e são assim chamadas por serem responsáveis pelos processos iniciais da replicação viral, no controle de sua transcrição e na transformação celular. As regiões tardias L1 e L2 são responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, como a síntese de

proteínas estruturais do capsídeo. A LCR é a região responsável pela modulação destes processos na célula do hospedeiro (VILLA, 1997). Na figura 1 observa-se o genoma circular do vírus representado por uma linha e as caixas mostram a posição dos genes L e E. Na região L1 evidenciam-se as posições de amplificação dos alvos e tamanhos esperados para os alguns pares de *primers*.

Fonte: KETLER et al. (1999)

Figura 1 – Representação esquemática das regiões do genoma do HPV e localização de diferentes pares de *primers*

A região L codifica as proteínas L1 e L2 que são transcritas somente em células infectadas. As partículas tipo vírus (VLPs – virus-like particles) podem ser produzidas pela expressão de L1 sozinha ou em conjunto com L2. As proteínas E1 e E2 regulam a replicação viral bem como a expressão de outros genes virais precoces. A proteína E4 forma redes de filamentos citoplasmáticos e interage com as citoqueratinas. Pelo menos 3 proteínas (E5, E6 e E7) codificadas pelos HPVs de alto risco são consideradas oncogênicas devido às suas propriedades transformadoras e estimuladoras de crescimento. Estas proteínas têm a habilidade de regular a função supressora de tumor ligando-se e inibindo as funções das proteínas p21, p53 e pRb, resultando em defeitos na apoptose. O reparo do DNA e o controle do ciclo celular, eventualmente, levam à imortalização celular (BOYER; WAZER; BAND, 1996; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007; IARC, 2007). As LCRs contêm sítios ligantes para os produtos genéticos de E1 e E2, localizados acima na sequência promotora P₉₇, que controla a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Há uma regulação dose-dependente da expressão de E6 e E7 por E2. Altos níveis da

proteína E2 resultam em repressão da expressão de E6 e E7 (STEGER, CORBACH; 1997).

O HPV é um vírus estritamente epiteliotrófico que estabelece infecção apenas no epitélio estratificado da pele, trato anogenital e mucosa oral. O ciclo de vida viral está associado à diferenciação da célula epitelial e se inicia nas células da camada basal, presumivelmente em locais de injúria. Os processos de integração viral levam a uma expressão seletiva de E6 e E7, que são marcadores de neoplasias cervicais (IARC, 2007).

A E5 é transcrita na forma episomal do DNA viral e a seqüência genética é deletada quando o HPV passa para a forma integrada. Portanto, a proteína E5 influencia nos efeitos carcinogênicos durante estágios precoces da infecção viral, e esta oncoproteína pode não ser requerida para a manutenção do fenótipo maligno. Não obstante, a proteína E5 estimula o crescimento celular através da ativação e regulação do fator de crescimento epidermal (EGFR), iniciando a cascata sinalizadora que leva a uma expressão aumentada de protooncogenes, bem como à repressão do inibidor 1A da quinase dependente da ciclina (CDKN1A/p21) (TSAI; CHEN, 2003).

A proteína E6 tem demonstrado propriedades estimuladoras de crescimento, agindo através de diferentes mecanismos pode ligar-se à p53 e tem como alvo a degradação proteossômica (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007).

A proteína E7 liga-se e degrada a proteína supressora de tumor pRB. A desestabilização da pRB leva a uma expressão aumentada do gene p16^{INK4a} dependente da ciclina que é considerado um marcador para a infecção por HPV (KHLEIF et al.; 1996).

Devido à habilidade de E6 e E7 em desregular o ciclo celular e estimular crescimento, estas oncoproteínas estão associadas à predisposição celular e à instabilidade genômica (WHITE; LIVANOS; TLSTY, 1994).

As proteínas codificadas por E6 e E7 são capazes de transtornar a expressão de proteínas reguladoras da replicação celular, das quais as mais estudadas e conhecidas são a proteína do retinoblastoma (pRB) e a p53. A ligação da proteína codificada por E7 à pRB, inibe o controle negativo da replicação celular, levando a uma contínua proliferação das células infectadas. Já a proteína E6 leva à

degradação de p53, inativando sua ação no controle negativo do ciclo celular e na reparação do DNA. Esta parece ser a principal causa da instabilidade cromossômica de células infectadas pelo HPV de alto risco, resultando em mutações. A presença de E6 e E7 também aumenta a integração de DNA estranhos ao genoma da célula hospedeira. A proteína E5 tem efeito sobre receptores de fatores de crescimento (EGF e PDGF), conferindo às células infectadas maiores chances de proliferação em relação às não infectadas (VILLA, 1997; Zur HAUSEN, 2000).

O papel da infecção viral na carcinogênese cervical foi estabelecido: pela presença regular do DNA-HPV em espécimes de tumores, pela expressão das oncoproteínas E6 e E7 no tumor, pela identificação de propriedades transformadoras destes genes, pela expressão de E6 e E7 na manutenção do fenótipo maligno das linhagens celulares do carcinoma cervical, pela interação da oncoproteínas virais com proteínas de reguladoras de crescimento do hospedeiro e por estudos epidemiológicos que apontaram que as infecções pelo HPV são fatores de risco principal para o desenvolvimento da neoplasia cervical (Zur HAUSEN, 2000).

Para o desenvolvimento de neoplasias cervicais é necessário uma infecção persistente por HPVs e a partícula viral deve penetrar na célula basal. Este fenômeno ocorre normalmente quando há um trauma. Nas células basais e parabasais o DNA viral replica em um baixo padrão e apenas genes precoces são transcritos. A multiplicação extensiva do DNA viral e a transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo ocorre apenas nas camadas superficiais do epitélio. O vírus se multiplica exclusivamente no núcleo de células infectadas, mas a manifestação patológica associada ao HPV ocorre nos sítios onde a infecção foi iniciada. Desta forma as partículas virais maduras (com capsídeos completos) estão ausentes nas células basais e a replicação produtiva do HPV está restrita às células das camadas espinhosa e granulosa (TERAI et al., 1999). A integração do genoma do HPV ao cromossomo do hospedeiro usualmente ocorre como um evento tardio, em lesões cancerizáveis ou na maioria dos carcinomas invasivos. É um processo aleatório com uma predileção pelos locais de fragilidade cromossômica. Especificamente em relação ao genoma viral a integração ocorre como uma quebra na sequência genética E1/E2. O rompimento da sequência viral E2 libera oncogenes, resultando em uma expressão aumentada de E6 e E7 e levando a uma alteração no mecanismo de supressão tumoral (WENTZENSEN; VINOKUROVA;

von KNEBEL DOEBERITZ, 2004). A expressão aumentada é um achado freqüente nos carcinomas cervicais e é necessária para a manutenção do fenótipo maligno (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007).

Muitos destes mecanismos descritos acima, com relação à ação das oncoproteínas são também implicados em tumores de cabeça e pescoço. O que suporta a hipótese de que o HPV tenha uma significativa participação na carcinogênese de tumores desta região, principalmente na carcinogênese oral, embora outros mecanismos estejam claramente envolvidos (HA; CALIFANO, 2004).

Recentemente foram desenvolvidas vacinas contra o HPV, que podem ser propostas nos casos de carcinomas orais associados ao HPV. Conceitualmente, 3 abordagens podem ser feitas quanto ao desenvolvimento de vacinas contra o HPV. Na primeira, procura-se bloquear a neoplasia induzida pelo HPV prevenindo que o vírus estabeleça uma infecção no epitélio, principalmente pela indução de anticorpos neutralizadores via capsídeo viral. Uma vacina profilática deve estimular a completa neutralização antes que a infecção ocorra. No entanto, isto pode promover menor benefício àqueles pacientes que já apresentem uma infecção ou uma displasia estabelecida. A segunda abordagem é direcionada à resposta imune (CD4+ e CD8+) que pode prevenir e induzir a regressão de lesões neoplásicas. A estratégia utiliza imunoterapia antígeno-específica, na qual células efectoras, particularmente células T, são direcionadas contra epítomos conhecidos por expressar células tumorais como E6 e E7. Finalmente, a terceira abordagem procura combinar total cobertura para pessoas apenas expostas aos HPVs de alto risco e para pessoas com infecções correntes e displasias (DEVARAJ; GILLISON; WU, 2003; IARC, 2007).

Diversos estudos de ensaios clínicos têm sido conduzidos em diferentes países investigando a eficácia das vacinas bivalente (HPV-16 e 18) e quadrivalente (HPV-6, 11, 16 e 18). Estas têm mostrado uma eficácia de 90% e 100%, respectivamente, em reduzir a incidência dos HPVs específicos (STANLEY; VILLA, 2008).

2.5.1 Detecção do HPV em mucosa oral clinicamente saudável

Uma grande variação na detecção da infecção pelo HPV em mucosa oral normal de indivíduos saudáveis tem sido relatada, numa extensão de 0% a 81,1% em estudos usando diferentes métodos de identificação e número de indivíduos (OLIVEIRA et al., 2003; HA; CALIFANO, 2004). Baixa prevalência de HPV em mucosa oral (1%) detectada por meio da PCR, em um grupo de indivíduos saudáveis, foi relatada por OSTWALD et al. (1994). Esta grande variação pode ser explicada não somente pela utilização de métodos distintos de identificação viral, mas também pelo método de coleta do DNA oral. Uma amostra mais representativa e significativa das regiões da boca pode ser obtida por meio de bochechos e coletas de citologia oral. Com isto apresentam maiores taxas de positividade para HPV do que quando amostras de tecidos orais saudáveis são avaliadas. (LAWTON et al., 1992).

Índices de detecção de 1% de HPV utilizando PCR associada à hibridização Southern Blot (OSTWALD et al., 1994) e 5,6% utilizando PCR (GIOVANNELLI et al., 2002) são descritas. De um modo geral, a prevalência da infecção por HPV em mucosa oral normal relatada é de até 10% (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

Outros dados mostraram uma detecção do HPV em 18,3% de indivíduos saudáveis sem história de neoplasia, sendo 10,8% de alto e 7,5% de baixo riscos. Em pacientes com carcinoma em região de cabeça e pescoço o vírus foi detectado em 28,4% dos casos, sendo 22,9% e 5,5% de alto e baixo riscos respectivamente (SMITH et al., 2004a).

Os genótipos do HPV mais freqüentemente encontrados, sejam em indivíduos saudáveis como em pacientes com lesões orais são HPV-6, 11, 16 e 18 (OLIVEIRA et al., 2003; OSTWALD et al., 1994; SMITH et al., 2004a; SYRJÄNEN; SYRJÄNEN; HAPPONEN, 1988; MILLER; JOHNSTONE, 2001).

Os HPV-16 e 18 podem estar presentes de forma assintomática ou latente. O HPV-18 foi o genótipo mais freqüentemente encontrado em mucosa oral normal (GIOVANNELLI, et al., 2002; TERAÍ et al., 1999). A infecção por HPV-18 na cavidade oral sem lesões sugere que o mesmo persiste ou freqüentemente infecta a mucosa oral, a qual pode atuar como um reservatório de vírus. No entanto,

permanece indefinido o exato mecanismo de carcinogênese destas infecções transitórias ou de longa duração (TERAI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003).

As infecções orais pelo HPV podem ser sub-clínicas e/ ou latentes e comumente apresentam um baixo número de cópias do vírus (TERAI et al., 1999).

A infecção pelo HPV na região cervical é muito bem abordada na literatura, desde a caracterização dos genótipos, a associação com lesões malignas e a transmissão, normalmente sexual, do vírus. Recentemente a infecção pelo HPV tem sido implicada na carcinogênese oral, laríngea e do esôfago. No entanto os mecanismos de transmissão nestas outras regiões ainda necessitam melhores esclarecimentos, principalmente em pacientes jovens e crianças. Os modelos de transmissão do HPV em crianças são controversos. Diversas hipóteses têm sido feitas quanto aos pacientes pediátricos, como a transmissão perinatal, vertical, auto e hetero-inoculação, abuso sexual e possível transmissão indireta via fomítes (SYRJÄNEN; PURANEN, 2000; SUMMERSGILL et al., 2001).

2.5.2 Detecção do HPV em lesões orais

A detecção do HPV em CEC da região de cabeça e pescoço é bastante variável, de 0 a 100%. Devido a esta grande variação, o papel do HPV na carcinogênese oral foi considerado por algum tempo incerto (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000). Diversos autores têm procurado mostrar uma associação entre a presença do HPV e o desenvolvimento de neoplasias em região de cabeça e pescoço (SMITH et al., 2004a). Recentemente, fortes evidências têm sugerido uma associação entre a presença do HPV e a carcinogênese nesta área, principalmente pelo fato que os mesmos genótipos oncogênicos em neoplasias cervicais são também observados em neoplasias em cabeça e pescoço (GILLISON et al., 2000). Foi determinado que o HPV é agente etiológico de um subgrupo de tumores de cabeça e pescoço. Sugeriu-se que existam pelo menos dois mecanismos etiológicos distintos na patogênese destes tumores, um mediado pelo uso de álcool e fumo e outro pela instabilidade genômica induzida pelo HPV (D'SOUZA et al., 2007; GILLISON et al., 2008).

A infecção pelo HPV de alto risco em células esfoliadas da boca é um fator de risco independente para o desenvolvimento de neoplasias na região da cabeça e pescoço, assim como o uso de álcool e tabaco (MILLER; JOHNSTONE, 2001; SMITH et al., 2004a; SMITH et al., 2004b). O vírus também pode agir sinergicamente com o consumo de álcool, já que este pode biologicamente alterar a mucosa oral aumentando a permeabilidade do tecido ao agente viral (SMITH et al., 2004a).

Foi demonstrado que a infecção por HPV é passo necessário para o desenvolvimento de neoplasias cervicais. Pelo menos um tipo de HPV está presente em 99,7% das lesões malignas uterinas (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000). As similaridades entre a cavidade oral e a região uterina com relação às características histológicas e embriológicas permitem estabelecer um paralelo entre lesões benignas, cancerizáveis e malignas de ambas as regiões (SYRJÄNEN et al., 1983). Acrescenta-se ainda que os genótipos mais freqüentes nos CEC cervicais e orais são os mesmos, permitindo traçar um paralelo também com relação à atividade viral de ambas regiões epiteliais (MILLER; JOHNSTONE, 2001). Dados laboratoriais e epidemiológicos sugerem que o HPV é um dos fatores causais de carcinomas orais e de orofaringe e apresenta os mesmos mecanismos descritos na patogênese do carcinoma cervical (HERRERO et al., 2003).

O HPV-16 foi detectado em 36% das mucosas orais normais, em 61% das displasias epiteliais e em 35% em CEC orais. Destes, os casos que progrediram de displasia epitelial para CEC apresentaram detecção significativamente maior de HPV-16. A prevalência de HPVs em lesões cancerizáveis e hiperqueratoses orais na população em geral, tem sido maior do que em lesões malignas, sugerindo que o vírus age como um iniciador na proliferação epitelial ou têm participação na fase inicial da carcinogênese do carcinoma oral (SUGIYAMA et al., 2003).

Foi demonstrado através de uma meta-análise que a probabilidade de detecção do HPV em mucosa oral normal é de 10%, nas lesões leucoplásicas benignas é 22,2%, nas neoplasias intraepiteliais é 26,2%, nos carcinomas verrucosos é 29,5% e nos CECs é de 46,5%. Esta probabilidade aumenta de acordo com a natureza displásica da lesão oral, havendo um substancial incremento nos CECs. Nestes casos a detecção de HPVs de alto risco foi 2,8 vezes maior do que os de baixo risco (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

Uma revisão sistemática da literatura abrangendo 5046 casos de CEC em região de cabeça e pescoço mostrou que prevalência de tumores HPV positivos é de 26%. Esta prevalência é maior em tumores da orofaringe (35,6%) do que em tumores da boca (23,5%) e da laringe (24%) (KREIMER et al., 2005). Portanto, o HPV tem papel mais importante na carcinogênese de lesões que acometem a orofaringe do que em lesões malignas da boca (HA; CALIFANO, 2004; HERRERO et al., 2003). O vírus foi detectado em 3,9% e 18,3% das amostras de tecidos de biópsias de CEC de boca e orofaringe, respectivamente. A partir de células esfoliadas da mucosa oral o HPV foi identificado em 4,7%, 8,9% e 6,9% dos pacientes com CEC de boca, e de orofaringe e indivíduos saudáveis, respectivamente. O HPV-16 foi o tipo mais freqüentemente encontrado em todas as localizações (HERRERO et al., 2003), este é o genótipo mais comum em CEC da região de cabeça e pescoço (GILLISON et al., 2000; HERRERO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003; SMITH et al., 2004a; KREIMER et al., 2005).

Os genótipos mais freqüentemente encontrados em amostras de CEC orais são os HPV-16 e o 18 (CRUZ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2003; MILLER; JOHNSTONE, 2001). A prevalência dos genótipos em CECs orais é de 16% para o HPV-16, 8% para o HPV-18 e 3% para o HPV-6, de acordo com uma revisão sistemática. Inversamente do que ocorre em tumores cervicais, o HPV-6, denominado não-oncogênico, ou de baixo risco, raramente é encontrado em lesões anogenitais malignas, e está associado a lesões benignas. A detecção deste vírus em amostras de biópsias não implica necessariamente causa, mas sim uma co-infecção na lesão, não relacionada à tumorigênese (KREIMER et al., 2005).

2.5.3 Métodos de identificação do HPV

Os métodos inicialmente utilizados para a detecção do HPV foram a hibridização direta com sondas como o Southern e Dot blot. No entanto, além de serem muito trabalhosos, consomem um tempo muito prolongado, apresentam sensibilidade baixa e requerem quantidades altas de DNA. Estas técnicas têm sido gradualmente substituídas pela tecnologia da PCR (amplificação do alvo), que

permite a detecção de um número pequeno de cópias virais em cada amostra (GARLAND; TABRIZI, 2006).

A PCR é um experimento capaz de amplificar de modo exponencial e reprodutível as seqüências de HPV presentes nas amostras de DNA. Geralmente a sensibilidade varia de 1 a 10 cópias por reação de PCR, e é alcançada pela maioria dos métodos utilizados (GARLAND; TABRIZI, 2006).

A maioria dos experimentos utiliza *primers* denominados “*consensus*” ou universais que amplificam a parte mais conservada do genoma do HPV, a região L1, permitindo a detecção de um grande número de HPVs em uma reação. Diversos pares de *primers consensus* são descritos na literatura como GP5/GP6 e o GP5+/GP6+ modificado, MY09/MY11 e PGMY09/11 e o SPF (DE RODA HUSMAN et al., 1995; JACOBS et al., 1995; KLETER et al., 1998; GARLAND; TABRIZI, 2006; ATALAY et al., 2007). Além dos *primers* pl-1 e pl-2, que são similares ao MY (HUSNJAK et al., 2000). Os pares de *primers* L1C1 e L1C2, também localizados na região L1, são capazes de detectar pelo menos 9 tipos de HPVs com grande eficiência (HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 e 58) e outros 2 tipos HPV-34 e 36, menos eficientemente (YOSHIKAWA et al., 1991).

Há vários *primers* situados na região L1, sejam degenerados (MY) ou *consensus* (GP). O sistema SPF emprega uma mistura de *primers* definidos para as regiões-alvo SPF1 e SPF2, que estão localizadas dentro das regiões dos *primers* MY e GP (KLETER et al., 1998). A amplificação com cada um destes pares de *primers* resulta em diferentes produtos de amplificação (Figura 2), variando a sensibilidade em detectar certos genótipos.

Figura 2 – Desenho esquemático representando os pares de *primers* MY, GP e SPF, na região L1 do genoma do HPV

Os sistemas MY09/MY11 e GP5+/GP6+ são os mais freqüentemente utilizados e avaliados clinicamente (VAN DEN BRULE et al., 2002).

Os *primers* MY09/MY11, PGMY09/11, GP5+/GP6+ e SPF10 são capazes de amplificar pelo menos 18 tipos de HPV, os mais comumente associados a neoplasias cervicais (HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 e 83) (KREIMER et al., 2005).

Durante a integração do genoma do HPV ao hospedeiro humano partes da região L1 podem estar deletadas e os *primers consensus*, que não se localizam nesta região são preferidos, como os da região E6. Em comparação com os *primers* E6, os *primers* da região L1 tem maior espectro de detecção dos HPVs (HUSNJAK et al., 2000).

GP5 e GP6 são complementares à região L1 localizados dentro da seqüência reconhecida pelo MY. Podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto com MY em *nested PCR*. A utilização de *nested PCR* para a detecção do HPV empregando os *primers* MY e GP são amplamente descritas na literatura (EVANDER et al., 1992; HUSNJAK et al., 2000), principalmente em lesões orais (SMITH et al. 2004b; GIOVANNELLI et al., 2006). Desta forma aumenta-se a eficiência de detecção do HPV provavelmente pelo produto de amplificação ser menor (~150bp) além de o GP não conter bases degeneradas como no MY (HUSNJAK et al., 2000).

Os *primers* GP5+/GP6+ apresentam uma sensibilidade menor do que o par de *primers* SPF, principalmente nos casos de citologia normal, em pacientes sem lesões cervicais (KLETER et al., 1999).

Atualmente as duas metodologias mais amplamente utilizadas para a detecção do HPV são o Hybrid Capture 2TM e a PCR com *primers consensus*. Ambos os testes apresentam sensibilidade e especificidade equivalentes, factíveis em estudos epidemiológicos e clínicos com grande número de pacientes (IARC, 2007).

O sistema SPF10-LiPA apresenta uma grande concordância no diagnóstico de HPVs de alto risco com o sistema Hybrid Capture 2TM. No entanto, este último é o único aprovado pela FDA (Food and Drug Administration). O sistema Hybrid Capture 2TM utiliza um coquetel de sondas de alto e baixo risco, mas não permite a tipagem e a diferenciação de infecções múltiplas ou únicas pelo HPV (SAFAEIAN et al., 2007).

Geralmente, os sistemas de PCR permitem a detecção de vários tipos do HPV já que os *primers* fazem o anelamento em uma região altamente homóloga de vários genótipos. Ultimamente percebe-se uma crescente necessidade em identificar os genótipos específicos do HPV a fim de esclarecer aspectos epidemiológicos e o comportamento clínico de tipos virais particulares. Além do mais, a tipagem do HPV é de grande importância na caracterização de estudos populacionais envolvendo a avaliação e o monitoramento da eficiência das vacinas contra o vírus (VAN DEN BRULE et al., 2002).

A tipagem do HPV pode ser realizada a partir do par de *primers* MY09/MY11 e um sistema *line blot* que também realiza a co-amplificação de um gene de controle interno, beta globina. Este teste, comercializado pela Roche Diagnostics, permite a tipagem de 27 genótipos do HPV (VERNON; UNGER; WILLIAMS, 2000).

Outro sistema disponível para a tipagem do HPV é o INNO LiPA (Innogenetics®, Gent, Bélgica). Este sistema utiliza os *primers* SPF que são capazes de amplificar um amplo espectro de genótipos de HPV, pelo menos 43 tipos. A associação deste par de *primers* com o sistema de hibridização reversa com sondas (LiPA) permite a detecção de diferentes genótipos de HPV mesmo que um tipo esteja presente em quantidade 1000 vezes maior do que o outro (KLETER et al., 1999). O pequeno produto de amplificação dos *primers* SPF confere uma sensibilidade analítica maior, mas possivelmente menor especificidade para a

detecção do HPV (SAFAEIAN et al., 2007). A capacidade de detecção de diferentes alvos de cada par de *primers* é limitada, e portanto a utilização de uma mistura de primers, como o sistema SPF10 pode ser mais eficaz que os *primers consensus*. O ponto de início de um *primer* (3') é crucial na eficiência da PCR, no alinhamento da sequência, e os *primers* SPF1 e SPF2 estão em uma região altamente conservada de todos os genótipos dos HPVs (KLETER et al., 1998).

A determinação do genótipo do HPV após a utilização de consensus primers pode ser realizada através do seqüenciamento de nucleotídeos, sondas oligonucleotídeas, hibridização (Southern dot blotting), ensaios imunoenzimáticos (EIA) dos produtos de PCR ou pela PCR com primers específicos (YOSHIKAWA et al., 1991; GILLIO-TOS et al., 2006; VAN DEN BRULE et al., 2002). No entanto, alguns destes métodos são muito trabalhosos (VAN DEN BRULE et al., 2002). Métodos de hibridização reversa utilizando evidenciação não radioativa, colorimetria com substratos foram propostos mais recentemente para a tipificação do HPV (GRAVITT et al., 1998; KLETER et al., 1998; VAN DEN BRULE et al., 2002). Estes testes utilizam tiras individuais de hibridização para cada produto de PCR que pode ser usada somente uma única vez, o que encarece a análise (VAN DEN BRULE et al., 2002).

Os métodos de hibridização reversa utilizam um produto de PCR biotilado que se hibridiza às sondas oligonucleotídeas imobilizadas. Este método permite a discriminação de múltiplos genótipos através de uma única hibridização e ciclo de lavagem (GRAVITT et al., 1998).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O propósito deste trabalho consistiu em realizar exame físico da boca de pacientes com Anemia de Fanconi, investigar possíveis alterações nas células epiteliais orais e determinar a presença do HPV na mucosa oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar lesões orais por meio do exame físico da boca.
- Observar as alterações morfológicas das células epiteliais obtidas de esfregaços da mucosa oral pela citologia em base líquida de acordo com a classificação de Papanicolaou.
- Avaliar por meio da citomorfometria as células de esfregaços coletados na mucosa oral.
- Determinar a prevalência do HPV nas amostras de esfregaços de células da boca por meio da PCR.
- Tipificar os genótipos do HPV presentes nas amostras por meio da hibridização reversa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob número 1131.170/2005-11 (Anexo A). A modificação realizada posteriormente à esta aprovação foi comunicada ao referido Comitê (Apêndice A).

4.1 DELINEAMENTO

A pesquisa consistiu de um exame clínico e citológico da boca utilizando uma amostra do tipo intencional de pacientes atendidos no Serviço de Transplante de medula óssea do Hospital de Clínicas (STMO/HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e análises moleculares para a detecção do HPV.

4.2 AMOSTRA

A amostra deste estudo foi constituída por 76 indivíduos de ambos os sexos e dividida em quatro grupos:

GRUPO I – representado por 20 pacientes portadores de Anemia de Fanconi submetidos ao TMO.

GRUPO II – representado por 22 pacientes portadores de Anemia de Fanconi não submetidos ao TMO.

GRUPO III – representado por 18 pacientes portadores de Anemia Aplástica Severa submetidos ao TMO.

GRUPO IV – representado por 16 indivíduos saudáveis não submetidos ao TMO, sem história recente de anemia e sem evidências de lesões malignas na mucosa oral.

Todos os pacientes dos grupos I e III receberam transplante de medula óssea alogênico de doador aparentado.

Os pacientes com AAS foram incluídos neste estudo como controle de pacientes submetidos ao TMO, pois a AAS não apresenta as mesmas características genéticas de suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de neoplasias.

O grupo IV representou o grupo controle caracterizado por indivíduos em boas condições de saúde. Foram utilizados critérios baseados no exame físico oral e anamnese minuciosa para exclusão de anemia, descritos por LU e WU (2004). A anamnese detalhada incluiu o questionamento de sinais e sintomas generalizados dos quadros de anemia como fraqueza, cansaço, dispnéia acentuada, palidez, taquicardia e hipotensão postural. Sintomas sugestivos de neuropatias como parestesias das extremidades, distúrbios do paladar e do olfato, depressão, irritabilidade e esquecimento também foram questionados (LU; WU, 2004). À inspeção visual as mucosas conjuntiva e oral e da região palmar não deveriam apresentar palidez, o que também foi considerado como critério clínico de exclusão da anemia.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Os indivíduos fumantes, etilistas e diabéticos foram excluídos deste estudo pela possibilidade de influenciar as medidas das células da mucosa oral (OGDEN; WIGHT; RICE, 1999; RAMAESH et al., 1999b; ALBERTI et al., 2003).
- Tempo de TMO inferior a três anos.
- Pacientes do grupo controle com quadro clínico sugestivo de anemia.

4.4 COLETA DE DADOS

Os pacientes foram convidados a participar do estudo e foi solicitado ao paciente ou seu responsável (quando menor de idade) que lesse e assinasse o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) que foi anexado à ficha clínica padrão de coleta de dados (Apêndice C).

Os pacientes foram examinados respeitando-se as normas de biossegurança no consultório odontológico do setor de Hematologia do STMO/HC da UFPR com auxílio de luz artificial por meio de refletor odontológico, luvas descartáveis, instrumental clínico, espátula de madeira e gaze.

Os dados obtidos durante a coleta de dados foram anotados na ficha clínica padrão específica individual sendo obedecida a seguinte ordem:

ANAMNESE: Identificação do paciente, história médica, história familiar, medicação utilizada e hábitos nocivos.

EXAME FÍSICO: Avaliação estomatológica do paciente seguindo-se a seqüência de exame do lábio superior e inferior, comissura labial, mucosa jugal direita e esquerda, assoalho da boca, língua, palato duro, palato mole, gengivas, região orofaríngea e dentes. O exame físico do paciente foi realizado seguindo-se rigorosamente o protocolo de avaliação estomatológica utilizado por SILVA (1997a). Especificamente para a avaliação das gengivas, foi considerado gengivite quando as gengivas não apresentaram aspecto de pontilhados em casca de laranja, com presença de sangramento, de eritema e/ou edema (CASTRO et al., 2000).

Para os pacientes submetidos a tratamento medicamentoso os dados referentes à terapêutica utilizada foram registrados, bem como o tempo de TMO.

A avaliação hematológica dos pacientes dos grupos I, II e III foi realizada baseando-se nos dados do hemograma no dia da realização do exame clínico e coleta da citologia em base líquida. Anemia é um sintoma, mas pode ser definida laboratorialmente pela diminuição das células vermelhas do sangue. Em prática, há uma diminuição da concentração da hemoglobina e do hematócrito. Para a avaliação foi estabelecido o critério: paciente anêmico ou não anêmico. Considerou-

se o paciente anêmico quando a concentração de hemoglobina estava abaixo de 11g/dL, de acordo com a classificação da OMS (OMS; 1972).

O delineamento experimental da pesquisa está ilustrado em um fluxograma na figura 3.

Figura 3 – Delineamento experimental da pesquisa

4.5 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Cada região anatômica da boca foi avaliada com o objetivo de detectar alterações do padrão de normalidade, utilizando como referência os parâmetros clínicos de normalidade descritos por CASTRO et al. (2000).

4.6 TÉCNICA DE CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA E PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Para a coleta das células epiteliais da mucosa oral foi utilizado o kit do Sistema DNA-CITOLIQ[®] denominado *Universal Collection Medium* (UCM) (Digene do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Este kit é composto por um frasco plástico contendo um mililitro da solução preservadora UCM e uma escova de cerdas de nylon do tipo *cytobrush*.

Antes da coleta das células, o paciente realizou um bochecho com água, a fim de remover restos necróticos ou alimentares que eventualmente estivessem presentes. A escova foi colocada na boca do paciente até que as cerdas encostassem-se à mucosa oral. A mesma foi girada cinco vezes no sentido horário nas seguintes regiões anatômicas: mucosas jugais bilateralmente, fundo de sulco vestibular superior e inferior, palato duro, palato mole, assoalho da boca, dorso, margens e face inferior da língua (Figura 4).

Figura 4 – Utilização da escova para coleta da amostra no palato duro (A) e língua (B)

Ao término da realização do escovado, a escova foi imersa no frasco contendo a solução UCM sendo este agitado por 30 segundos (s) para homogeneização da amostra. Os frascos foram armazenados de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram processadas em laboratório para coloração pela técnica de Papanicolaou. O aparato laboratorial do Sistema Digene® (São Paulo, Brasil), necessário para a confecção das lâminas, é composto de um porta-frascos (UCM rack), de uma prensa (Prepgene), de suportes para 12 lâminas (Lamigene) e para 12 membranas de policarbonato, cada uma com 25 mm de diâmetro (Filtrogene) (Figura 5).

Fonte: Sistema DNA-CITOLIQ, 2002

Figura 5 – Aparato laboratorial do Sistema Digene® **A:** Porta-frascos (UCM Rack). **B:** Prensa (Prepgene). **C:** Suporte para lâminas (Lamigene). **D:** Membranas de polycarbonato (Filtrogene)

O processamento laboratorial das lâminas foi realizado no laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Doze lâminas foram processadas por vez. Os frascos foram retirados do refrigerador e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos (min). Após este período foram individualmente homogeneizados por 15 s em agitador de tubos do tipo vórtex¹. Foram pipetados 200 μ L da solução em cada frasco e dispensados sobre uma membrana de polycarbonato. Após a realização deste procedimento para os 12 frascos, a tampa do Prepgene foi fechada, aguardando-se 10 s. A tampa do prepgene foi aberta e as lâminas foram retiradas para a realização dos processos de fixação (20 min em álcool etílico a 95%) e coloração de Papanicolaou conforme seqüência descrita no quadro representado na figura 6.

Após a utilização dos 200 μ L da solução os frascos foram armazenados em freezer a - 20°C para posterior realização da extração do DNA das amostras.

¹ Vortex Biomatic®, 2.500 rpm.

Passos	Substância Química	Procedimento
1	Álcool Etílico 95%	10 – 15 mergulhos
2	Álcool Etílico 80%	10-15 mergulhos
3	Álcool Etílico 50%	10-15 mergulhos
4	Água destilada	10-15 mergulhos
5	Hematoxilina de Harris	1 min
6	Água corrente	2 min
7	HCl 0.5% em H ₂ O destilada	2 mergulhos
8	Água corrente	2 min
9	Álcool Etílico 50%	10-15 mergulhos
10	Álcool Etílico 80%	10-15 mergulhos
11	Álcool Etílico 95%	10-15 mergulhos
12	Álcool Absoluto	10-15 mergulhos
13	OG-36	1 mergulho
14	Álcool Absoluto	10-15 mergulhos
15	Álcool Absoluto	10-15 mergulhos
16	Álcool Absoluto	10-15 mergulhos
17	EA-36	1 min
18	Álcool Absoluto	10 mergulhos
19	Álcool Absoluto	10 mergulhos
20	Álcool Absoluto	10 mergulhos
21	Álcool Absoluto	10 mergulhos
22	50/50 Xilol e Álcool	10-15 mergulhos
23	Xilol	10-15 mergulhos
24	Xilol	10-15 mergulhos
25	Xilol	10-15 mergulhos
26	Xilol	10-15 mergulhos

Fonte: Sistema DNA-CITOLIQ, 2002

Figura 6 – Quadro descritivo da sequência da técnica de coloração de Papanicolaou

Após a coloração as lâminas foram analisadas por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX50 (Olympus®, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus, Japão) e objetivas PLAN 4X/0,10, 10X/0,25, 20X/0,40 e 40X/0,65 (Olympus, Japão) acoplado a uma câmera de vídeo Sony CCD Iris Color Video Camera™ (Sony DXC-107A, Japão). Para a captura das

imagens utilizou-se o sistema de análise de imagem *Image-Pro Plus*TM (Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA) (Figura 7). Previamente à leitura, as lâminas tiveram suas identificações cobertas para evitar viés.

As lâminas foram avaliadas quanto à presença de alterações nucleares ou celulares e classificadas de acordo com os critérios de Papanicolaou. Os dados foram anotados em uma ficha de registro da citologia (Apêndice D).

Figura 7 – Captura da imagem com a objetiva 40X utilizando o programa *Image-Pro Plus*TM

4.7 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS CITOLÓGICOS

A avaliação dos esfregaços baseou-se nos critérios de malignidade descritos e preconizados por SILVA (1997b) e ROMANINI (1999):

Alterações celulares: pleomorfismo nuclear ou formas bizarras, pleomorfismo celular, anisocitose, anisocariose, aumento do volume celular e alterações displásicas.

Alterações nucleares: aumento do tamanho do núcleo, aumento na proporção núcleo: citoplasma, hipercromasia nuclear, presença de grumos e cordões grosseiros de cromatina, nucléolos aumentados em tamanho e/ou múltiplos, multinucleação celular com presença de nucléolos atípicos e mitoses atípicas.

Quanto à presença ou ausência de alterações morfológicas (nucleares e citoplasmáticas), os esfregaços foram classificados de acordo com os critérios de Papanicolaou (ROMANINI, 1999; SILVA, 1997b; ROCHA, 2000):

Classe 0: material inadequado ou insuficiente para a análise.

Classe I: células com padrão morfológico normal, ausência de infiltrado inflamatório.

Classe II: células com características de benignidade e presença de alterações inflamatórias (mudança na relação núcleo-citoplasma, multinucleação e presença de halos perinucleares).

Classe III: alterações displásicas discretas, apresentando algumas características de malignidade.

Classe IV: presença de células fortemente sugestivas de malignidade. Células da camada basal e parabasal redondas ou ovais, com núcleo em posição central, nucléolos volumosos e citoplasma reduzido.

Classe V: alterações celulares compatíveis com neoplasias malignas, como presença de núcleo hipercromático, acentuado pleomorfismo nuclear, espaços vazios e grânulos grosseiros de cromatina. As células podem apresentar mitoses atípicas, pleomorfismo celular e evidente alteração na proporção núcleo: citoplasma.

4.8 ANÁLISE CITOMORFOMÉTRICA

Foram capturadas imagens de células das diferentes camadas epiteliais de forma aleatória, utilizando-se um aumento de 400X, de maneira que todas as áreas da lâmina fossem igualmente representadas. Para a captura das imagens foi empregado um movimento da plataforma do microscópio sempre da direita para a esquerda e de cima para baixo para evitar que a mesma célula fosse medida mais de uma vez. Utilizou-se o programa computacional *Image-Pro Plus*TM (Media Cybernetics, Silver

Spring MD, USA) para a realização das mensurações de 50 células em cada lâmina (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1985; OGDEN, WIGHT, RICE, 1999). Foi selecionada a ferramenta “área” do referido programa e com uso do cursor realizou-se o delineamento dos limites, primeiramente da área que circundava o citoplasma e secundariamente da área do núcleo. Todas as células avaliadas deveriam estar dispostas de forma plana na lâmina, não poderiam estar enroladas, dobradas ou distorcidas e seus limites deveriam ser bem claros e evidentes (Figura 8). Após a realização do delineamento das células em cada imagem, selecionava-se o ícone “exportar dados” e os valores obtidos pelas mensurações da área do citoplasma (CA) e do núcleo (NA) eram enviados para o programa Microsoft Office Excel para Windows® (Figura 9). As mensurações das 50 células de cada paciente da amostra foram salvas em planilhas individuais. Os valores da CA e NA obtidos pelo programa são expressos em micrômetros ao quadrado (μm^2). Calculou-se a média dos valores da NA e da CA das 50 células de cada paciente e posteriormente foi obtido o valor da razão núcleo/citoplasma destes e em cada caso o desvio padrão. Os valores das médias da NA e da CA e da razão NA/CA dos pacientes foram calculados levando-se em consideração o grupo ao qual o paciente fazia parte.

Figura 8 – Mensuração da área do núcleo e do citoplasma utilizando o programa *Image-Pro Plus*

Microsoft Excel - Exemplo excell

Arquivo

Editar

Exibir

Inserir

Formatar

Ferramentas

Dados

Janela

Ajuda

Figura 9 – Exportação dos dados referentes às mensurações da área do núcleo e do citoplasma para o programa Microsoft Office Excel para Windows®

4.9 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS

As extrações do DNA das amostras de escovado da boca foram realizadas tomando-se como base a técnica documentada por WOO et al., 1997. O procedimento foi realizado no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP).

Os frascos UCM contendo as amostras da citologia esfoliativa foram inicialmente deixados em temperatura ambiente por 30 min e homogeneizados em agitador (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil). Para cada uma das amostras, pipetou-se todo o líquido remanescente, que variou de 500 a 800 µL da solução, e este foi transferido para um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL, sendo a solução diluída e homogeneizada em água destilada estéril na proporção de 1:2 (volume/volume). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 min em microcentrifuga refrigerada (Heraeus Biofuge 15R, Heraeus Equipment Ltd, Brentwood, UK) a 4° C.

O *pellet* resultante foi lavado em água destilada estéril descartando-se o sobrenadante e acrescentou-se 1.000 µL de água; os tubos foram homogeneizados no agitador e centrifugados a 10.000 x g por 5 min. Este processo de lavagem do “*pellet*” foi realizado 3 vezes para cada amostra.

O sobrenadante foi novamente descartado, e o “*pellet*” suspenso em 100 µL de água livre de DNase e RNase (Qiagen gmbH, Hilden, Alemanha) e 100 µL de matriz de purificação InstaGene Matrix[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Em seguida, o conteúdo deste tubo foi transferido para um tubo de microcentrifuga estéril de 0,5 mL e incubado a 56°C por 30 min em termociclador (Progene, Techne, Cambridge, UK). As amostras foram novamente homogeneizadas e fervidas durante 10 min para obtenção do DNA. Realizou-se nova centrifugação (10.000 x g por 3 min) para remover células não lisadas e restos celulares de tamanho grande. Após a centrifugação, 170 µL do sobrenadante foram pipetados e transferidos para um novo tubo de microcentrifuga estéril identificado. O DNA de cada paciente, devidamente identificado por números, foi armazenado em freezer a -80 °C para posterior análise por PCR.

4.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A detecção viral foi realizada no Laboratório “Epidemiologia dei Tumori” da Universidade de Turim, Itália, utilizando-se técnicas moleculares de PCR.

As especificidades de todos os *primers* foram confirmadas usando-se o programa BLAST do National Center for Biotechnology Information Server (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), o qual verifica se os *primers* utilizados se hibridizam exclusivamente com regiões que conferem a identidade do vírus procurado, ou seja, se há 100% de homologia entre os pares de *primers* e a dupla fita do DNA viral. As seqüências de todos os *primers* utilizados e os tamanhos antecipados dos produtos de amplificação são apresentados em um quadro ilustrado na figura 10.

Inicialmente, para a verificação do processo de extração e da integridade do DNA todas as amostras foram submetidas à avaliação do gene de controle interno beta globina. Somente após a confirmação da presença de DNA procedeu-se com

todas as outras reações. A avaliação do gene da beta globina foi realizada por meio da PCR em tempo real e será descrita posteriormente.

Em todas as reações para o detecção do HPV foram incluídos: DNAs das linhagens celulares CasKi e SiHa (ATCC, Manassas, WA, Estados Unidos) como controles positivos para o HPV, e água estéril como controle negativo para assegurar a ausência de contaminação nas reações. A linhagem celular CasKi contem de 400 a 600 cópias do HPV-16 integrado ao genoma, e a SiHa que contem 1 a 2 cópias do HPV-16 integrado ao genoma no cromossomo 13 (DE MARCO et al., 2007).

Alvo	Primer Senso (5' – 3')	Primer Anti-senso (3' – 5')	Tamanho
Beta globina*	TGGGTTTCTGATAGGCACTGACT	AACAGCATCAGGAGTGGACAGAT	152 pb
MY09/MY11 [∞]	CGTCCMARRGGAWACTGATC	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	450 pb
GP5+/GP6+ [#]	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG	150 pb
SPF [£]	GCiCAGGGiCACAATAATGG	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA	65 pb
SPF 10 (INNO LiPA)	Não informado pelo fabricante		65 pb

Figura 10 – *Primers* utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação (# DE RODA HUSMAN et al., 1995; # JACOBS et al., 1995; £ KETLER et al., 1998; * VAN DUIN et al., 2002; [∞] ATALAY et al., 2007)

4.10.1 PCR MY09/MY11

Inicialmente a detecção do HPV nas amostras foi realizada seguindo a técnica descrita por ATALAY et al. (2007) que usaram o par de *primers* MY09/MY11 que amplifica um produto de aproximadamente 450 pb na região L1 capaz de identificar diversos tipos de HPV.

As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,2mL para um volume final de 25 µL, utilizando-se os seguintes reagentes: 2,5 µL de solução tampão para PCR 10X (KCl₂ 10mmol, Tris HCl ph 8) (Roche[®], Indianapolis, Estados

Unidos), 25mM de $MgCl_2$ (Roche[®], Indianapolis, Estados Unidos), 10mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dNTP) (Advanced Biotechnologies, Warrington, Reino Unido) 50 μ M de cada *primer* MY09 e MY11, 1 unidade de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems[®], Foster City, California, Estados Unidos). Utilizou-se 5 μ L de DNA de cada amostra.

A ciclagem térmica de amplificação do DNA foi realizada em um termociclador GeneAmp[®] 9700, PCR System Thermal Cycler, Applied Biosystems (Foster City, California, Estados Unidos) conforme descrito na figura 11.

Fase	Temperatura	Tempo	
Passo 1 Desnaturação	94°C	5 min	
Passo 2 Desnaturação	94°C	20 s	
Passo 3 Anelamento dos primers	55°C	45 s	40 ciclos passos 2 a 4.
Passo 4 Extensão	72°C	1 min	
Passo 5 Extensão final	72°C	7 min	

Figura 11 – Perfil térmico das reações de amplificação para o par de *primers* MY09/MY11 (ATALAY et al., 2007)

Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados por meio de uma eletroforese horizontal em gel de agarose 2%.

Para o preparo do gel, utilizou-se 100 mL de solução tamponada composta por Trisma base, ácido bórico e EDTA (TBE 1X), 2 g de agarose e 7 μ L de brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Montado o sistema de eletroforese horizontal (Bio Rad Sub Cell[®] GT, Power Pac 300, Hercules, California, USA) despejou-se a mistura e dois pentes foram adicionados. Após a polimerização do gel (aproximadamente 30 min), os pentes foram retirados, e o gel coberto com tampão para eletroforese (TBE 1X).

Em seguida, iniciou-se o carregamento do gel com uma alíquota de 10 μ L de cada amostra submetida à PCR, acrescida de 1 μ L de tampão de carregamento (azul de bromofenol e glicerol). Em uma das extremidades do gel, também se utilizou-se uma alíquota de 2 μ L de padrão de peso molecular de 100pb (Roche Diagnostics[®], Mannheim, Alemanha), acrescida de 1 μ L de tampão de carregamento e 8 μ L de água destilada estéril. A eletroforese foi realizada utilizando-se uma corrente de 120 V durante 60 min.

Após a eletroforese, o gel de agarose foi analisado utilizando-se o sistema Gel Doc 2000 (BioRad®, Hercules, California, USA). Através do programa Multi-Analyst (BioRad®, Hercules, California, USA) realizou-se imediatamente a fotodocumentação para registro da presença de produtos amplificados. Os produtos de PCR são observados sob a forma de bandas nas faixas dos tubos do gel. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com o controle positivo utilizado e o marcador de peso molecular.

4.10.2 “*Nested*” PCR GP5+/GP6+

Uma segunda reação de PCR foi realizada utilizando-se o material amplificado com os *primers* MY09/MY11. A *nested* PCR possibilita a eliminação de produtos não específicos e geralmente melhora a robustez da reação e o limite de detecção do vírus.

Utilizou-se o par de *primers* GP5+/GP6+ e protocolo térmico (Figura 12) descritos por DE RODA HUSMAN et al. (1995) e JACOBS et al. (1995). As reações de amplificação do DNA foram realizadas em um termociclador GeneAmp® 9700, PCR System Thermal Cycler, Applied Biosystems (Foster City, California, Estados Unidos).

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL em tubos 0,2mL. Utilizou-se 2,5 µL de solução tampão para PCR 10X (KCl₂ 10mmol, Tris HCl ph 8) (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos), 25mM de MgCl₂ (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos), 20mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dNTP) (Advanced Biotechnologies, Warrington, Reino Unido), 50µM do *primer* senso GP5+ e anti senso GP6+, 0,2 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems®, Foster City, California, Estados Unidos) e 2 µL do produto de amplificação da reação de PCR com os *primers* MY09/MY11.

Fase	Temperatura	Tempo	
Passo 1 Desnaturação	94°C	4 min	
Passo 2 Desnaturação	94°C	1 min	
Passo 3 Anelamento dos primers	40°C	2 min	40 ciclos passos 2 a 4.
Passo 4 Extensão	72°C	1,5 min	
Passo 5 Extensão final	72°C	4 min	

Figura 12 – Perfil térmico das reações de amplificação para o par de *primers* GP5+/GP6+ (JACOBS et al., 1995)

Após a amplificação as amostras foram analisadas por meio da eletroforese horizontal em gel de agarose 2% e foto-documentadas através de transiluminação ultravioleta, conforme descrito anteriormente.

4.11 GENOTIPAGEM DO HPV

As amostras positivas em PCR para os *primers* MY09/MY11 e GP5+/GP6+ foram tipificadas. A tipificação do HPV foi realizada utilizando-se duas metodologias baseadas no sistema de hibridização reversa. As amostras positivas foram amplificadas usando o sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp (Innogenetics®, Gent, Bélgica) e o sistema Digene High Risk HPV Genotyping kit (Digene Corporation®, Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

4.11.1 Sistema INNO-LiPA

O sistema INNO-LiPA é composto por 2 fases.

Amplificação do DNA por PCR

O sistema INNO-LiPA utiliza um par de *primers* consenso que tem como alvo uma região bem conservada, ORF L1, do genoma do HPV. O par de *primers* SPF10 de 65 pb pode amplificar um largo espectro de genótipos deste vírus, pelo menos 54

tipos e identifica 27 genótipos (SAFAEIAN et al., 2007). O fabricante do sistema informa apenas que utiliza primers SPF10 que é composto dos *primers* SPF e uma mistura de outros 6 *primers* na mesma região.

Os reagentes fornecidos pelo fabricante são: mistura de amplificação e a mistura que contem a enzima. A mistura de amplificação contem dNTPs, incluindo trifosfato deoxiuridina, *primers* biotinilados, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e NaN_3 como preservante. E a mistura da enzima contém uma polimerase de DNA termoestável e a enzima uracil-N-glicosilase (UNG). Um passo de incubação antes da amplificação remove as bases uracila de qualquer produto contaminante que possa estar presente na mistura. A temperatura ótima da enzima UNG é 37°C quando permite clivar produtos ricos em uracila evitando resultados falso-positivos, e é inativada quando a temperatura é aumentada durante a desnaturação a 95°C.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL . Todos os reagentes foram brevemente homogenizados em agitador de tubos do tipo vórtex. Utilizou-se para cada reação 18,85 μL da mistura de amplificação, 1,15 μL da mistura de enzima e 5 μL de DNA de cada amostra.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador GeneAmp® 9700, PCR System Thermal Cycler, Applied Biosystems (Foster City, California, Estados Unidos). As amostras foram amplificadas seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, conforme figura 13. Foram incluídos um controle positivo que contem HPV-6, fornecido pelo fabricante do sistema e um controle negativo (água).

Fase	Temperatura	Tempo	Descrição
Passo 1 Descontaminação	37°C	10 min	Degradação da uracila
Passo 2 Desnaturação	94°C	9 min	Inativação da UNG e ativação da enzima DNA polimerase
Passo 3 Desnaturação	94°C	30 s	40 ciclos passos 3 a 5.
Passo 4 Anelamento dos primers	52°C	45 s	
Passo 5 Extensão	72°C	45 s	
Passo 6 Extensão final	72°C	7 min	

Fonte: Manual INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics®, Gent, Bélgica)

Figura 13 – Perfil térmico das reações de amplificação do sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra

Foi realizada uma segunda etapa de amplificação (*re* PCR) com os mesmos reagentes e pares de *primers* utilizados na primeira etapa visando aumentar a sensibilidade e especificidade do método. Nesta segunda amplificação o ciclo foi alterado removendo-se o passo de ativação da UNG. Após esta etapa os produtos também foram analisados por meio da eletroforese horizontal em gel de agarose 2%. Após a amplificação o DNA foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior tipificação através da hibridização reversa.

Hibridização Reversa

O princípio da genotipagem deste teste baseia-se na hibridização reversa com sondas oligonucleotídeas em tiras de membrana de nitrocelulose. Parte da região L1 do HPV é amplificada usando o par de *primers* SPF10, e os produtos da amplificação biotinilados são desnaturados e hibridizados com sondas oligonucleotídeas específicas. Todas as sondas são imobilizadas em linhas paralelas nas tiras. Após a hibridização e lavagem estridente adiciona-se um conjugado de fosfatase alcalina-estreptavidina que se liga ao híbrido biotinilado formado previamente.

O sistema é capaz de identificar 27 tipos de HPV, sendo todos os 18 tipos considerados de alto risco (HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82), bem como 10 tipos de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 43, 44, 54, 69, 70 e 71). As tiras contêm um par de *primers* adicional para a amplificação do gene DPB1 – HLA (DP beta 1 - human leukocyte antigen) para monitorar a qualidade da amostra e extração do DNA.

O processamento consiste em um passo inicial de hibridização do DNA amplificado na tira, seguido de uma lavagem estridente, adição de solução de conjugado e substrato que realizam a evidênciação colorimétrica (Figura 14).

Reagentes	Volume	Procedimento
1. Solução Desnaturante	10 µL	Adicionar em todas as canaletas
DNA amplificado	10 µL	Adicionar a solução desnaturante
2. Solução de hibridização	2mL	Adicionar a solução em todas as as canaletas
(pré- aquecida a 49°C)		
Tiras	1 tira	Adicionar 1 tira em cada canaleta
		Incubar a 49°C por 60 min em banho-maria oscilante
		Aspirar todo o líquido
3. Solução de lavagem	2 X 2mL	Lavar 2 vezes por 10-20 s
Estringente (pré- aquecido a 49°C)		
	2mL	Adicionar em todas as canaletas
		Incubar a 49°C por 30 min em banho-maria oscilante
		Aspirar o líquido das canaletas
4. Solução de Enxágüe	2 X 2mL	Lavar 2 vezes por 1 min
		Aspirar todo o líquido
5. Solução de Conjugado	2mL	Adicionar o conjugado em todas as as canaletas
		Incubar por 30 min em temperatura ambiente em um agitador oscilante.
		Aspirar o líquido das canaletas
6. Solução de Enxágüe	2 X 2mL	Lavar as tiras 2 vezes por 1 min
		Aspirar o líquido das canaletas
7. Solução de Substrato	2mL	Adicionar em todas as canaletas
		Incubar por 30 min em temperatura ambiente em agitador oscilante.
		Aspirar o líquido
Água destilada	2 X 2mL	Lavar as tiras 2 vezes por 3 min
		Aspirar o líquido
		Colocar as tiras sobre papel para secagem

Fonte: Manual INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics®, Gent, Bélgica)

Figura 14 – Etapas do processamento das tiras de nitrocelulose para a genotipagem do HPV com o sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra

As tiras contém: uma linha de controle do conjugado, uma linha de controle de DNA humano (*primers* que amplificam um fragmento do gene DPB1-HLA), duas linhas de controle HPV positivo, e 28 linhas correspondentes às sondas oligonucleotídeas.

Foram efetuadas 18 amostras por teste, e dentre estas obrigatoriamente foram incluídos um controle positivo fornecido pelo fabricante (HPV-6) e um controle negativo (água).

As figuras 15 e 16 ilustram os materiais e reagentes utilizados na genotipagem do HPV empregando este sistema.

Figura 15 – Bancada com reagentes para a realização da hibridização reversa utilizando o sistema INNO LiPA Genotyping Extra. Suporte e canaletas (→) e tiras de nitrocelulose (↓)

Figura 16 – Canaletas com as tiras de nitrocelulose e solução de conjugado (à esquerda, líquido amarelo) para a evidência das bandas e tipificação do HPV e cronômetro (à direita).

Interpretação dos resultados

As tiras foram interpretadas após estarem completamente secas. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram pelo menos uma linha tipo-específica positiva, e/ou pelo menos 1 linha de controle HPV positiva. Para a análise realizou-se a interpretação visual das tiras em uma folha de leitura de acordo com o cartão de leitura fornecido pelo fabricante e uma tabela de interpretação das sondas e tipos de HPV (Anexos B, C e D). As amostras que apresentaram a linha de controle HPV positiva, porém não apresentaram marcação pelas sondas específicas foram consideradas HPV positivas não tipificadas (genótipo não identificado).

4.11.2 Sistema Digene Consensus High risk HPV genotyping kit

O sistema Digene[®] Consensus High risk HPV genotyping é semelhante ao anteriormente descrito, composto por uma fase de amplificação dos produtos por PCR e uma segunda fase de tipagem pelo método de hibridização reversa. O sistema é capaz de identificar os 18 tipos de HPVs de alto risco. Este sistema está em teste em laboratórios de todo o mundo, e ainda não está disponível comercialmente.

Amplificação do DNA por PCR

O fabricante fornece uma mistura de PCR denominada mistura padrão GP5+/6+ pronta para uso. Há apenas a indicação de que os *primers* utilizados são biotinilados, mas os outros reagentes não são informados.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. A master mix fornecida foi brevemente homogeneizada em agitador de tubos do tipo vórtex. Utilizou-se para cada reação 23 µL desta master mix e 2 µL de do produto de amplificação com os *primers* MY09/MY11.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador GeneAmp[®] 9700, PCR System Thermal Cycler, Applied Biosystems[®] (Foster City, Califórnia, Estados Unidos). As amostras foram amplificadas seguindo o protocolo sugerido pelo

fabricante conforme representado no quadro abaixo (Figura 17). Foram incluídos um controle positivo que contem HPV-16, fornecido pelo fabricante do sistema e um controle negativo (água). Após a amplificação todos os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 2%.

Fase	Temperatura	Tempo	Descrição
Passo 1 Desnaturação	94°C	9 min	Ativação da AmpliTaqGold
Passo 2 Desnaturação	94°C	20 s	
Passo 3 Anelamento dos primers	38°C	30 s	40 ciclos passos 2 a 4.
Passo 4 Extensão	71°C	1,20 min	
Passo 5 Extensão final	71°C	4 min	

Fonte: Manual Digene® Consensus High risk HPV genotyping

Figura 17 – Perfil térmico das reações de amplificação com o sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping

Após a amplificação o DNA foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior tipificação através da hibridização reversa.

Hibridização Reversa

O sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping baseia-se princípio da hibridização reversa in vitro para a identificação de HPVs de alto risco. Os produtos de amplificação biotinilados desnaturados como resultado da amplificação de parte da região L1 com *primers* GP5+/GP6+ são hibridizados com sondas oligonucleotídeas, que são imobilizadas em paralelo em tiras de membranas. Após a hibridização e lavagem estridente, uma fosfatase alcalina-estreptavidina conjugada é adicionada e liga-se ao híbrido biotinilado formado previamente. Uma incubação com o agente cromógeno BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphatase/ Nitroblue Tetrazolium) produz um precipitado de cor roxa de forma a poder ser interpretado visualmente nas membranas (Figura 18).

O sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping é capaz de identificar os seguintes tipos de HPV: HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82.

Reagentes	Volume	Procedimento
1. Solução Desnaturante	10 µL	Adicionar em todas as canaletas
DNA amplificado	10 µL	Adicionar a solução desnaturante Incubar em temperatura ambiente por 5 min
2. Solução de hibridização (pré- aquecida a 50°C)	2mL	Adicionar a solução em todas as canaletas
Tiras	1 tira	Adicionar 1 tira em cada canaleta Incubar a 50°C por 60 min em banho-maria oscilante Aspirar todo o líquido
3. Solução de lavagem Estringente (pré- aquecido a 50°C)	2 X 2mL	Lavar 2 vezes por 10-20 s
	2mL	Adicionar em todas as canaletas Incubar a 49°C por 30 min em banho-maria oscilante Aspirar o líquido das canaletas
4. Solução de Enxágüe	2 X 2mL	Lavar 2 vezes por 1 min Aspirar todo o líquido
5. Solução de Conjugado	2mL	Adicionar o conjugado em todas as canaletas Incubar por 30 min em temperatura ambiente em um agitador oscilante. Aspirar o líquido das canaletas
6. Solução de Enxágüe	2 X 2mL	Lavar as tiras 2 vezes por 1 min Aspirar o líquido das canaletas
7. Solução de Substrato	2mL	Adicionar em todas as canaletas Incubar por 30 min em temperatura ambiente em um agitador oscilante. Aspirar o líquido
Água destilada	2 X 2mL	Lavar as tiras 2 vezes por 3 min Aspirar o líquido Colocar as tiras sobre papel para secagem

Fonte: Manual Digene® Consensus High risk HPV genotyping

Figura 18 – Etapas do processamento das membranas de nitrocelulose para a genotipagem do HPV com o sistema Digene® Consensus High risk HPV genotyping

As tiras contém: uma linha de controle do conjugado, uma linha de controle HPV-16 positivo e 18 linhas correspondentes às sondas oligonucleotídeas específicas.

Foram efetuadas 18 amostras por teste, e dentre estas obrigatoriamente foram incluídos um controle positivo fornecido pelo fabricante (HPV-16) e um controle negativo (água) para verificação de ausência de contaminação e validação do teste.

Interpretação dos resultados

As tiras foram interpretadas após estarem completamente secas. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram pelo menos uma linha HPV positiva. Para a análise realizou-se a interpretação visual das tiras de acordo com uma folha de leitura fornecida pelo fabricante (Anexo E).

4.12 SEQÜENCIAMENTO DO GENOMA DO HPV

As amostras positivas para GP5+/GP6+ em *nested* PCR, as amostras positivas não identificadas pelo sistema INNO-LiPA e High Risk Digene foram preparadas para realização do seqüenciamento direto. Após a amplificação do DNA (*nested* PCR MY/GP) das amostras em termociclador, os produtos da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e comparados visualmente com um controle positivo e um padrão de peso molecular conhecido. As amostras que apresentaram a banda no tamanho esperado foram cortadas com lâmina de bisturi estéril sob luz ultravioleta. Os fragmentos de gel cortados contendo as referidas bandas foram purificados utilizando-se o kit NucleoSpin Extract II, PCR Clean up gel extraction® (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e as reações de seqüenciamento foram realizadas no Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). A posterior precipitação do DNA as reações de seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático ABI 310 automated capillary system (Applied Biosystems®, Foster City,

California, Estados Unidos). As seqüências foram analisadas com o BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (DE MARCO et al., 2007).

4.13 PCR EM TEMPO REAL

4.13.1 Identificação e quantificação do gene Beta globina

A quantificação do DNA humano contido em cada amostra foi realizada pela evidenciação do gene de controle interno, beta globina (JANSSENS et al., 2004).

O DNA do gene beta globina foi testado em paralelo como controle e para verificação do processo de extração e integridade do DNA assim como para a avaliação do número de células presentes em cada amostra. A avaliação quantitativa foi realizada utilizando-se o sistema SYBR Green no termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, California, Estados Unidos) seguindo-se o protocolo descrito por VAN DUIN et al. (2002).

Uma curva de calibração externa utilizando DNA de placenta humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) em diluições de 10 vezes correspondentes a 0,2 a 200 nanogramas/ μL (2×10^{-1} a 2×10^2) foi incluída em cada experimento, assim como um controle negativo (água). A curva padrão foi realizada em triplicata e cada amostra em duplicata.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL . Para cada amostra utilizou-se uma solução de mistura 2X SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, California, Estados Unidos) que contem: 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/ml iTaq DNA polimerase, 6 mM MgCl_2 , SYBR Green I, 20 nM estabilizadores fluorescentes; 0,3 μM dos *primers* senso e antisenso beta globina 152bp (Operon Biotechnologies – Molecules for life®, Cologne, Alemanha) e 1 μL de DNA de cada amostra. O perfil térmico para o gene beta globina está descrito na figura 19.

Fase		Temperatura	Tempo	Descrição
Ciclo 1 (1X)	Passo 1	95°C	1,5 min	
Ciclo 2 (50X)	Passo 1	95°C	15 s	
	Passo 2	50°C	1 min	Dados coletados
Ciclo 3 (1X)	Passo 1	95°C	1 min	
Ciclo 4 (1X)	Passo 1	55°C	1 min	
Ciclo 5 (80X)	Passo 1	55°C	10 s	Análise: curva de dissociação

Figura 19 – Perfil térmico das reações de amplificação para o gene beta globina em PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green (Van Duin et al., 2002)

Nas reações de PCR em tempo real utilizando-se o SYBR Green a fluorescência é medida após o passo de anelamento dos *primers*. Para gerar os dados da curva de dissociação a temperatura foi aumentada em 0,5 °C a cada ciclo (a partir de 55 °C no ciclo 5).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos no qual a amplificação atinge um dado limiar, caracterizado pelo sinal de fluorescência que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A quantidade de DNA em nanogramas em cada amostra é calculada pelo programa iCycler (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, California, Estados Unidos) baseado nos valores dados pela curva padrão levando-se em consideração a média da quantidade das amostras (reação em duplicata). Os valores obtidos foram expressos em nanogramas por microlitro.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A classificação dos esfregaços foi avaliada pelos testes de Pearson e Qui-quadrado quanto às classes citológicas e grupos estudados.

O teste Qui-quadrado e a análise de Games-Howell foram utilizados na comparação da média dos valores de NA, CA e NA/CA entre os grupos estudados.

Foi realizada análise dicotômica para a presença ou ausência da anemia em todos os grupos estudados calculando-se o percentual para estas variáveis de acordo com o grupo. Não foi aplicado um teste estatístico específico, pois não há anêmicos e não anêmicos em todos os grupos.

O teste exato de Fischer foi utilizado na análise da positividade para o HPV e comparação entre os grupos estudados. Foi realizado o teste global da hipótese nula para confirmar a associação entre estas variáveis.

O risco relativo estimado (crude odds ratio - OR) foi calculado para os grupos experimentais I, II e III, assumindo o grupo IV (controle) como referência. A idade do paciente e o tempo de TMO foram incluídos como parâmetros e analisados estatisticamente para verificar se exerciam influência no risco relativo estimado para a presença de HPV. Inicialmente, verificou-se a distribuição das idades em relação aos 4 grupos experimentais e dividiu-se em 4 categorias de acordo com o percentual de número de casos por faixa etária. No entanto, esta estratificação não permitiu obtenção de dados aceitáveis em virtude do reduzido tamanho da amostra. Desta forma, a análise foi dicotomizada de acordo com a média das idades dos pacientes (17 anos) resultando em 2 categorias: ≤ 17 e > 17 anos. Igualmente, realizou-se uma análise dicotômica para a variável tempo de TMO (média 10 anos) entre os grupos I e III. Foi calculado o risco relativo estimado de ambos os grupos em relação à presença do HPV para verificar se este apresentava aumento ou diminuição quando ajustado em relação ao tempo de TMO.

Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se os programas StataCorp (Stata Statistical Software Release 10, College Station, TX: StataCorp LP, 2007) e GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software Inc, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

A amostra foi constituída por 76 pacientes, sendo 20 do grupo I (portadores de Anemia de Fanconi transplantados), 22 do grupo II (portadores de Anemia de Fanconi não transplantados), 18 do grupo III (portadores de Anemia Aplástica transplantados) e 16 do grupo IV (indivíduos em bom estado geral de saúde). O sexo, a idade e tempo de TMO dos pacientes são demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição do sexo, idade e tempo de TMO de acordo com os grupos estudados

Grupos Variável	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
Sexo	F	M	F	M	F	M	F	M
	08	12	13	09	08	10	07	09
Idade	10 – 31 anos		4 – 18 anos		21 – 58 anos		4 – 37 anos	
Média	17,50 anos		9,86 anos		34,77 anos		16,12 anos	
Tempo de TMO	3,4 – 13,5 anos		-		5 – 23 anos		-	
Média	8,3 anos		-		12,4 anos		-	

F: Feminino, M: Masculino

5.1 EXAME FÍSICO

Os pacientes foram avaliados quanto à presença de lesões orais ou alterações da normalidade.

No grupo I foram observados: 4 casos de gengivite, 2 casos de hiperqueratose (uma mucosa jugal e outro em palato duro), 1 caso de leucoplasia, 1 caso de ulceração aftosa recorrente (UAR), 1 caso de microstomia, 1 caso de candidose eritematosa e pseudomembranosa, 1 caso de glossite migratória benigna e 9 pacientes não apresentaram alterações dignas de nota.

No grupo II foram encontradas as seguintes alterações: 3 casos de gengivite, 3 úlceras traumáticas (localizadas na língua, mucosa alveolar e mucosa jugal), 1

pigmentação melânica gengival, 1 verruga vulgar, 1 caso de UAR, 1 caso de hiperplasia gengival associada ao uso de ciclosporina, e 13 pacientes não apresentaram alterações ao exame físico.

No grupo III foram detectados: 2 casos de pigmentação melânica gengival, 1 caso de hiperplasia gengival associada ao uso de ciclosporina, 1 caso de UAR, 1 úlcera traumática pelo uso de prótese, 1 caso de candidose eritematosa em palato, 1 caso de gengivite, 1 paciente apresentou língua saburrosa, 10 pacientes não apresentaram alterações dignas de nota ao exame físico.

No grupo IV apenas um paciente apresentou UAR, enquanto que 15 pacientes não apresentaram alterações ao exame físico.

Todos os pacientes que apresentaram lesões ao exame físico receberam orientações quanto ao tratamento e/ou receberam tratamento odontológico no serviço de Odontologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

Os dados obtidos na anamnese referentes às medicações utilizadas pelos pacientes de acordo com os grupos estudados estão descritos no Apêndice E.

Dois pacientes, um do grupo I e outro do grupo II, foram a óbito durante o desenvolvimento desta pesquisa. A avaliação do exame hematológico nos prontuários não pôde ser realizada, pois o arquivo geral do HC/UFPR reteve os prontuários e não permitiu a consulta. Os dados obtidos na avaliação do hemograma permitiram a classificação anêmico e não anêmico dos pacientes dos grupos I, II e III e estão demonstrados no Apêndice F.

No grupo I, 19 pacientes (100%) apresentaram hemograma normal; no grupo II, 17 pacientes (76,2%) estavam anêmicos e 4 não anêmicos (23,8%); no grupo III apenas 1 paciente (5,6%) estava anêmico enquanto que 18 pacientes (94,4%) não estavam anêmicos; e todos os 16 pacientes do grupo IV não apresentaram sinais clínicos anemia (100%). Para melhor ilustração a avaliação do quadro anêmico em relação aos grupos estudados está descrita na figura 20.

Figura 20 – Distribuição dos pacientes anêmicos e não anêmicos nos grupos estudados

5. 2 ANÁLISE CITOLÓGICA E CITOMORFOMÉTRICA

As amostras coletadas por meio da citologia em base líquida foram processadas conforme descrito na metodologia e os dados obtidos foram analisados de acordo com a presença de alterações morfológicas para os critérios diagnósticos e quanto aos critérios de malignidade.

Os esfregaços foram submetidos à coloração e classificação de Papanicolaou (Figura 18), sendo 67,10% (51 esfregaços) classe I e 32,90% (25 esfregaços) classe II. Esfregaços de classe 0, III, IV ou V não foram encontrados entre as lâminas avaliadas. O grupo I apresentou 60% (12) classe I e 40% dos esfregaços (8) de classe II. O grupo II apresentou 63,63% dos esfregaços (14) de classe I e 36,36% (8) de classe II. O grupo III apresentou 61,11% dos esfregaços (11) de classe I e 38,89% (7) classe II. e o grupo IV apresentou 87,5% dos esfregaços (14) classe I e 12,5% (2) de classe II. A figura 21 mostra a classificação das amostras em relação aos grupos, após a aplicação do teste do qui quadrado.

O teste exato de Fischer foi aplicado para comparar a presença da inflamação nos grupos experimentais em relação ao grupo IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II e III (individualmente) em relação

ao grupo IV para a presença de inflamação, isto é, classe II ($p=0,1435$; $0,1251$; $0,1326$; respectivamente). Ao analisar os grupos I e II conjuntamente para a presença de inflamação nos esfregaços das células orais em relação ao grupo IV, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,1070$), bem como ao avaliar os grupos I, II e III conjuntamente em relação ao grupo IV ($p=0,07$).

Figura 21 – Classificação das amostras dos esfregaços orais de acordo com a classificação de Papanicolaou e distribuição nos grupos estudados

As figuras 22 e 23 mostram dois esfregaços das células epiteliais orais classes I e II de Papanicolaou, respectivamente, com fins ilustrativos.

Figura 22 – Esfregaço das células epiteliais orais com coloração de Papanicolaou, classe I, ausência de inflamação. **A:** Aumento 4X. **B:** Aumento 10X. **C:** Aumento 20X. **D:** Aumento 40X

Figura 23 – Esfregaço das células epiteliais orais com coloração de Papanicolaou, classe II, com presença cocos, debris e hifas fúngicas. **A:** Aumento 20X. **B:** Aumento 40X. Cocos (→) Hifas (↓) Debris (*)

Os valores das médias das variáveis NA, CA e NA/CA e os respectivos desvios padrão das 50 células epiteliais avaliadas por meio da análise citomorfométrica são descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Valores da área do núcleo (NA), área do citoplasma (CA) e razão NA/CA das células epiteliais da mucosa oral de acordo com os grupos estudados

Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	P valor
Variável	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	
NA	57,65 μm^2 ± 22,06	57,34 μm^2 ± 22,77	56,32 μm^2 ± 21,53	52,60 μm^2 ± 17,84	0,0000*
CA	2558,16 μm^2 ± 1084,85	1963,33 μm^2 ± 829,25	1715,47 μm^2 ± 715,61	1722,05 μm^2 ± 602,59	0,0000*
NA/CA	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,0000*

Para melhor visualização, os dados descritos na tabela 2 estão ilustrados nas figuras 24 a 26.

Foi realizada Análise Games-Howell para as múltiplas comparações entre os grupos estudados. Os grupos I, II e III apresentaram um aumento da NA estatisticamente significativa em relação ao grupo IV ($p=0,0003$; $0,000003$; $0,00000$, respectivamente). Não houve diferença estatística entre os grupos I, II e III. ($p=0,884966$; $0,627043$; $0,960844$; respectivamente) (Figuras 24).

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IV

Figura 24 – Média e intervalo de confiança da área do núcleo (NA) nos grupos estudados

Os grupos I e II apresentaram um aumento da CA estatisticamente significativo em relação ao grupo IV ($p=0,00000$, $0,00000$, respectivamente). O grupo III apresentou diminuição da CA, estatisticamente significativa quando comparado aos grupos I e II ($p=0,00000$) (Figura 25).

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IV

Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos I e II

Figura 25 – Média e intervalo de confiança da variável CA nos grupos estudados

A razão NA/CA mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III com o grupo IV ($p=0,00000$; $0,00004$, respectivamente). O grupo III apresentou um aumento da razão NA/CA e o grupo I apresentou uma diminuição desta razão quando comparado ao grupo IV. Observou-se também diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II e III ($p=0,00000$) (Figura 26).

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IV

Figura 26 – Média e intervalo de confiança da razão NA/CA nos grupos estudados

5.3 PREVALÊNCIA DO HPV

A verificação da integridade do DNA foi confirmada pela amplificação por PCR em tempo real do gene beta globina no sistema SYBR Green. Todas as amostras foram positivas para tal gene e a quantidade de DNA de cada amostra encontra-se detalhada no Apêndice G. A figura 27 ilustra um exemplo de curva de dissociação encontrado quando realizada a PCR em tempo real para o gene beta globina.

*Controles negativo (água)
#Curva padrão e amostras

Figura 27 – Ilustração da PCR em tempo real para o gene beta globina com o sistema SYBR Green. A: Gráfico de amplificação. B: Curva de dissociação dos produtos de amplificação

O seqüenciamento do genoma do HPV não permitiu a tipificação das amostras analisadas. Não foi possível identificar os genótipos pela análise das seqüências obtidas avaliando-se o eletroferograma.

Desta forma, as amostras foram consideradas positivas para o HPV quando foram observadas bandas nos tamanhos esperados de acordo com cada par de *primer* utilizado (MY09/MY11 e GP5+/GP6+) ou na evidenciação das tiras de nitrocelulose correspondentes aos genótipos específicos ou não tipificados. A tabela 3 mostra os resultados obtidos em todos os métodos empregados, de acordo com os grupos estudados. A figura 28 exemplifica o produto de amplificação com os *primers* MY09/MY11 e GP5+/GP6+.

Figura 28 – Géis de agarose 2% revelando amostras positivas após a amplificação com os pares de primers MY09/MY11 (A) e GP5+/GP6+ (B). Controle negativo (C-). Controle positivo (C+). Marcador de peso molecular (M). Poço não utilizado (X)

Tabela 3 – Detecção e genotipagem dos HPVs nas amostras estudadas

GRUPO	AMOSTRA	MY09/MY11	GP5+/GP6+	INNO LiPA	GP5/GP6 Digene	DIGENE	RESULTADO FINAL	GENÓTIPO
I	23	Negativo	Positivo	HPV 6	Positivo		Positivo	HPV 6
I	29	Negativo	Negativo				Negativo	
I	30	Negativo	Negativo				Negativo	
I	32	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	HPV 16	Positivo	HPV 16
I	33	Negativo	Negativo				Negativo	
I	39	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	HPV 16	Positivo	HPV 16
I	40	Negativo	Negativo				Negativo	
I	43	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	HPV 16,18	Positivo	HPV 16, 18
I	50	Negativo	Negativo				Negativo	
I	51	Negativo	Negativo				Negativo	
I	52	Negativo	Negativo				Negativo	
I	56	Negativo	Negativo				Negativo	
I	58	Negativo	Negativo				Negativo	
I	69	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	HPV 16	Positivo	HPV 16
I	70	Negativo	Negativo				Negativo	
I	73	Negativo	Negativo				Negativo	
I	74	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Não tipificado
I	77	Positivo	Positivo	HPV 16			Positivo	HPV 16
I	78	Negativo	Negativo				Negativo	
I	81	Negativo	Negativo				Negativo	
I	82	Negativo	Negativo				Negativo	
II	2	Negativo	Negativo				Negativo	
II	3	Negativo	Negativo				Negativo	

II	4	Negativo	Negativo				Negativo	
II	5	Negativo	Negativo				Negativo	
II	6	Negativo	Negativo				Negativo	
II	8	Negativo	Negativo				Negativo	
II	9	Negativo	Negativo				Positivo	
II	10	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Não tipificado
II	14	Negativo	Positivo	HPV 6			Positivo	HPV 6
II	15	Negativo	Positivo	Não tipificado	Positivo	HPV 16	Positivo	HPV 16
II	18	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não tipificado
II	19	Negativo	Negativo				Negativo	
II	20	Negativo	Negativo				Negativo	
II	21	Negativo	Negativo				Negativo	
II	31	Negativo	Negativo				Negativo	
II	35	Negativo	Negativo				Negativo	
II	36	Negativo	Negativo				Positivo	
II	37	Negativo	Positivo	Não tipificado	Positivo	HPV 16	Negativo	HPV 16
II	38	Negativo	Negativo				Negativo	
II	44	Negativo	Negativo				Positivo	
II	59	Positivo	Positivo	HPV 18			Negativo	HPV 18
II	83	Negativo	Negativo				Positivo	
III	1	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não tipificado
III	7	Negativo	Negativo				Negativo	
III	11	Negativo	Negativo				Negativo	
III	12	Negativo	Negativo				Negativo	
III	13	Negativo	Negativo				Negativo	
III	16	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	HPV 18	Positivo	HPV 18
III	17	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Não tipificado
III	42	Negativo	Negativo				Negativo	
III	45	Positivo	Positivo	Não tipificado	Positivo	HPV 16	Positivo	HPV 16
III	46	Negativo	Negativo				Negativo	
III	47	Positivo	Positivo	HPV 16			Positivo	HPV 16
III	53	Negativo	Negativo				Negativo	
III	71	Negativo	Negativo				Negativo	
III	72	Negativo	Negativo				Negativo	
III	75	Positivo	Positivo	HPV 6			Positivo	HPV 6
III	76	Positivo	Negativo		Positivo	HPV 58	Positivo	HPV 58
III	79	Negativo	Negativo				Negativo	
III	80	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	22	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	24	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	25	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	26	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	27	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	28	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	34	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	41	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	48	Negativo	Negativo				Negativo	
IV	49	Negativo	Negativo				Positivo	
IV	54	Positivo	Positivo	Não tipificado	Negativo	Negativo	Negativo	Não tipificado

IV	55	Negativo	Negativo	Negativo
IV	57	Negativo	Negativo	Negativo
IV	60	Negativo	Negativo	Negativo
IV	61	Negativo	Negativo	Negativo
IV	63	Negativo	Negativo	Negativo

Verificou-se que 35% dos pacientes do grupo I foram positivos para HPV, 27,27% dos pacientes do grupo II, 38% dos pacientes do grupo III e 6,25% dos pacientes do grupo IV.

A positividade para o HPV em relação aos grupos e genótipos classificados quanto ao risco estão representadas na figura 29 e na tabela 4.

Figura 29 – Prevalência do HPV nos grupos estudados e classificação de acordo com o risco de transformação maligna

Tabela 4 – Distribuição das amostras positivas de acordo com os grupos estudados e genótipos encontrados

Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Número de amostras positivas/número total grupo	7/20	6/22	7/18	1/16
Alto risco	5	3	4	-
HPV-16	4	2	2	-
HPV-18	-	1	1	-
HPV-58	-	-	1	-
HPV-16, 18	1	-	-	-
Baixo risco	1	1	1	-
HPV-6	1	1	1	-
Não tipificado	1	2	2	1

Da tabela acima vale a pena ressaltar dos HPVs detectados, o HPV-16 foi o mais freqüente. No grupo I o HPV-16 representou 71,42% dos HPVs encontrados, no grupo II 33,33%, no grupo III 28,57% e no grupo IV o HPV-16 não foi detectado.

Foi avaliada a hipótese de independência aplicando-se o teste exato de Fischer para comparar a prevalência do HPV entre os grupos estudados. Inicialmente cada grupo foi individualmente comparado com o grupo controle. Observou-se que os grupos I e III apresentam uma prevalência do HPV significativamente maior que o grupo IV ($p=0,049$ e $p=0,04$, respectivamente). Não foi observada maior prevalência do HPV estatisticamente significativa entre os grupos II e IV ($p=0,2$). Analisando-se os grupos I, II e III conjuntamente observou-se maior prevalência estatisticamente significativa em relação ao grupo IV ($p=0,049$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à prevalência do HPV entre os grupos I e III ($p=1$) e entre os grupos I e II ($p=0,74$). Analisou-se, ainda, os grupos I e II conjuntamente em relação ao grupo IV, que apresentou um valor de $p=0,08$. A tabela 5 mostra a comparação entre os grupos.

Tabela 5 – Teste de independência para a variável prevalência do HPV entre os grupos estudados aplicando-se o teste exato de Fischer

Grupos experimentais	Valor p
Grupo I <i>versus</i> Grupo IV	0,049
Grupo II <i>versus</i> Grupo IV	0,2
Grupo III <i>versus</i> Grupo IV	0,04
Grupo I <i>versus</i> Grupo III	1
Grupo I <i>versus</i> Grupo II	0,74
Grupos I, II <i>versus</i> Grupo IV	0,08
Grupos I, II, III <i>versus</i> Grupo IV	0,049

Foi calculado o risco relativo (odds ratio - OR) estimado para a infecção pelo HPV nas células epiteliais orais, bem como o OR ajustado em relação à idade (Tabela 6). A idade do paciente e o tempo de TMO foram considerados na análise quanto ao risco de infecção pelo HPV nos grupos I e III. Observou-se que o OR aumenta nos pacientes com aumento do tempo de TMO e com a idade (Tabela 7).

Tabela 6 – Risco relativo (OR) estimado e risco relativo ajustado em relação à idade, e respectivos intervalos de confiança (IC), para infecção pelo HPV nos grupos estudados

Grupos	OR estimado	IC 95%		OR Idade	IC 95%	
Grupo I	8,08	0,88	74,59	7,76	0,83	72,29
Grupo II	5,63	0,60	52,37	5,00	0,50	49,88
Grupo III	9,55	1,02	89,22	11,27	1,01	125,41
Grupo IV	1,00	-	-	1,00	-	-

Tabela 7 – Risco relativo (OR), risco relativo ajustado em relação à idade do paciente, ao tempo de TMO, e respectivos intervalos de confiança (IC), para infecção pelo HPV nos grupos I e III

Grupos	OR		OR Idade + tempo		OR tempo		OR	
	estimado	IC 95%	TMO	IC 95%	TMO	IC 95%	Idade	IC 95%
Grupo I	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-
Grupo III	1,18	0,32 4,42	4,91	0,44 54,51	1,82	0,41 8,11	3,82	0,38 38,82

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ANEMIA DE FANCONI

A base genética da Anemia de Fanconi é extremamente complexa e o real papel das proteínas no reparo do DNA ainda permanece incerto. Parece plausível entender que outros fatores estejam presentes, além da instabilidade genômica, e que expliquem a elevada suscetibilidade às neoplasias malignas.

É demasiado simples pensar na AF como uma desordem puramente de defeito de reparo no DNA. Assim como em outras desordens é necessária uma abordagem integrada, em pesquisa básica e clínica para um melhor entendimento da doença. Durante muito tempo as características clínicas da AF foram descritas com base em relatos de casos. Ainda hoje muitos estudos apresentam dados com grupos pequenos de pacientes. Devido à raridade da doença é difícil realizar estimativas dos vários fatores de risco associados à elevada taxa de incidência de malignidades (DOKAL, 2008).

O exame físico oral do paciente com AF é de grande importância, pois permite identificar alterações da normalidade. Exames complementares, como a citologia esfoliativa, são de grande valia no acompanhamento de pacientes de alto risco para o desenvolvimento de lesões malignas (RAMAESH et al., 1999a). A avaliação do paciente deve ser realizada antes, durante e após o tratamento, principalmente após o TMO, em virtude das possíveis complicações. O Registro Internacional da Anemia de Fanconi (IFAR) aponta que o TMO contribui para um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias malignas (KUTLER et al. 2003b).

A possibilidade da participação de fatores de risco associados, além da predisposição genética, salienta a necessidade de advertir os pacientes com AF quanto aos agentes ambientais carcinogênicos o mais precocemente possível (DOKAL; 2008).

O manejo dos pacientes com AF começa com uma meticulosa anamnese e exame físico, testes laboratoriais e de triagem para neoplasias. A AF é verdadeiramente uma doença multisistêmica e a avaliação clínica deve ser realizada

em todos os órgãos. Várias áreas, além da hematologia, devem estar envolvidas, como cardiologia, odontologia, endocrinologia, ginecologia, oncologia, cirurgia de cabeça e pescoço, oftalmologia, otorrinolaringologia, cirurgia plástica, neurologia e radiologia. O controle de tumores sólidos, como o CEC, é melhor realizado por equipes de odontólogos, cirurgiões de cabeça e pescoço e ginecologistas (ALTER, 2007).

O diagnóstico precoce das neoplasias malignas na AF tem importante repercussão no prognóstico do paciente. A remoção cirúrgica é a melhor opção terapêutica, visto que os pacientes apresentam baixa tolerância à quimioterapia e à radioterapia (REINHARD et al., 2007). Estas terapias são raramente consideradas no tratamento de neoplasias na AF pelos efeitos deletérios de mielossupressão nos pacientes com aplasias medulares (KUTLER et al., 2003a).

6.2 EXAME FÍSICO

Há poucos dados na literatura referentes às características orais da AF. Ao exame físico ficou evidente que os pacientes com AF, tanto do grupo I como do grupo II, isto é, transplantados e não transplantados de medula óssea, respectivamente, apresentam inflamação gengival. A análise descritiva do exame físico mostrou que a gengivite foi a alteração oral mais encontrada nestes pacientes. Foi descrito anteriormente que a gengivite é uma alteração comum nos pacientes com AF (AÇIKGÖZ et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007) e está associada à pobre higiene oral e não à condição hematológica (ARAUJO et al., 2007), já que a maioria dos pacientes não realiza escovação dos dentes regularmente (TEKCICEK et al., 2007). A gengivite não foi uma alteração frequente nos grupos III e IV. A média de idade do grupo III é mais elevada do que nos grupos I e II, podendo-se supor, portanto, que pacientes adultos tenham um cuidado maior com a higiene e saúde oral do que crianças, o que contribui para o início de um processo inflamatório nas gengivas nas crianças. O grupo IV apresentou média de idade muito semelhante ao grupo I, o que não permite inferir a mesma justificativa, porém deve-se ressaltar que este grupo foi composto por pessoas saudáveis, sem

queixas e alterações orais. Ressalta-se ainda que não foi objetivo específico deste estudo realizar uma avaliação periodontal minuciosa e não foram avaliados os índices específicos de doença periodontal; a gengivite foi avaliada apenas como uma inflamação gengival observada clinicamente.

Foram detectados 2 casos de hiperplasia gengival associada ao uso de ciclosporina (grupos II e III). Este tipo de alteração gengival é amplamente descrita na literatura odontológica (RAMALHO et al., 2003). A ciclosporina é indicada no tratamento da AAS por ter um efeito seletivo na função das células T devido à direta inibição na expressão de proteínas reguladoras, o que resulta em proliferação e ativação reduzida destas células. Embora o paciente do grupo III tivesse sido submetido ao TMO há 13 anos, a medicação estava sendo utilizada com o intuito de melhorar a hematopoiese em função de uma recaída. Casos de hiperplasia gengival em paciente com AAS em terapia imunossupressora são comumente relatados (BRENNAN et al., 2001; SEPÚLVEDA et al., 2006). Baseando-se na observação de que o mecanismo imune possa suprimir a hematopoiese, o tratamento da AAS com imunossupressor tem sido considerado uma boa escolha para os pacientes que sofrem recaída após o TMO e para aqueles que não possuem doador HLA compatível (MARSH, 2000; PITA et al., 2001). A ciclosporina tem diversos efeitos colaterais, mas a maioria deles é controlável com a redução da dose. A manutenção dos níveis das células sangüíneas é alcançada com doses realmente baixas da droga, de modo que o nível sangüíneo é indetectável e a toxicidade é mínima, mesmo após anos de tratamento (YOUNG; CALADO; SCHEINENBERG, 2006).

Estes dois pacientes que apresentaram a hiperplasia gengival associada ao uso da ciclosporina receberam orientações de higiene oral e foram encaminhados para tratamento no serviço odontológico do setor de Hematologia do STMO/HC da UFPR. A Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (PITA et al., 2001) enfatiza a necessidade da higiene oral adequada devido à hiperplasia gengival, que pode ocorrer secundariamente ao uso da ciclosporina, e recomenda ao paciente o acompanhamento odontológico desde o início do tratamento medicamentoso com o intuito de receber orientações sobre os cuidados locais. Um alerta é necessário aos pacientes neutropênicos com AAS que necessitam de procedimentos odontológicos, sendo recomendada a prescrição de antibioticoterapia profilática com penicilina oral.

No grupo II foi observado um caso de verruga vulgar. Não foi realizada a remoção da lesão por discordância do paciente. Este paciente apresentou HPV-16 nas células epiteliais orais, embora a pesquisa do HPV não tenha sido realizada diretamente do tecido da lesão. A presença de verruga vulgar diagnosticada clinicamente foi relatada anteriormente (ARAUJO et al., 2007).

Um caso de UAR foi observado em cada grupo no momento do exame físico. As UARs foram relatadas anteriormente em pacientes com AF (AÇIKGÖZ et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007). NOWZARI et al. (2001) afirmaram serem freqüentes os episódios de UAR em pacientes com pancitopenia na AF. OTAN et al. (2004) relataram o caso de duas irmãs com AF que apresentaram UARs com resolução do quadro clínico após melhora das condições hematológicas. Destes pacientes avaliados pelo nosso estudo, apenas o paciente do grupo II apresentava-se anêmico ao exame físico, enquanto que os pacientes dos grupos I e III apresentaram a série vermelha, ao hemograma, dentro dos padrões de normalidade.

A glossite migratória benigna ou língua geográfica, observada em um paciente do grupo I, é uma condição indolor de causa desconhecida caracterizada por placas eritematosas devido à descamação das papilas filiformes. Embora a língua geográfica fosse bem evidente clinicamente e este paciente não apresentasse anemia, a literatura pertinente relata que alguns casos de despilação da língua são associados aos quadros de anemia (RANASINGHE et al., 1983; LU, WU; 2004). Estes casos são caracterizados pela língua lisa e conseqüentemente brilhante, de característica não migratória. Principalmente na anemia por deficiência de ferro há uma atrofia da língua e redução da espessura do epitélio oral (MONTÓ; RIZEK; FINE, 1961; RANASINGHE et al., 1983; LU, WU; 2004). A atrofia papilar também foi relatada na AF (TEKCICEK et al., 2007). As alterações clínicas no epitélio oral são muito freqüentes em pacientes com quadros anêmicos por deficiência de ferro, como a glossite atrófica, queilite angular e disfagia (JACOBS, 1982).

Dois casos de candidose foram diagnosticados (grupo I e III) e medicados com um antifúngico tópico. A candidose é uma doença fúngica comumente presente em pacientes com debilidades imunológicas e pode ser observada em vários tipos de anemias (LU; WU, 2004). Apesar da deficiência imune associada à citopenia característica da AF, a maioria dos pacientes não apresenta dificuldades em

controlar infecções (LOWLY; GILLISON, 2003). Algumas crianças com AF podem ser mais suscetíveis a infecções do que crianças normais, por uma redução no número e na função das células NK (natural killer) (TEKCICEK et al., 2007). Nos dois casos da nossa amostra os pacientes utilizavam próteses total e parcial e não apresentavam anemia quando o exame foi realizado, sendo portanto presumível que as infecções fúngicas estivessem associadas ao uso das próteses e não necessariamente pela possível debilidade imunológica ou à pancitopenia. A candidose foi relatada como uma manifestação freqüente em pacientes com AAS em terapia imunossupressiva (BRENNAN et al., 2001; SEPÚLVEDA et al., 2006).

Apesar da elevada incidência de neoplasias na AF, lesões malignas não foram detectadas ao exame físico. Uma lesão cancerizável leucoplásica em língua em um paciente do grupo I foi removida realizando-se uma biópsia excisional. As células epiteliais orais deste paciente, seja do escovado total da boca e do específico da lesão, não apresentaram alterações citológicas, apenas um infiltrado inflamatório leve, portanto classe II de Papanicolaou. A avaliação histológica mostrou uma mucosite liquenóide de interface não plana. Neste caso, o diagnóstico final foi de uma leucoplasia, de acordo com as características clínicas, já que as características histológicas foram inespecíficas. É importante salientar que o paciente não fazia uso de medicações há mais de 5 anos, portanto é possível excluir a hipótese de reação medicamentosa a algum fármaco. Nossos dados corroboram os de Tekcicek et al. (2007), que avaliaram um grupo de 26 pacientes com AF e não observaram lesões cancerizáveis. Neste caso da leucoplasia, dois fatores de risco devem ser considerados: o tempo de TMO e a localização da lesão na língua. Este paciente havia sido submetido ao TMO há 10 anos. O risco em desenvolver um tumor sólido aumenta com o tempo de TMO e a média de desenvolvimento de tumores é de 8 anos pós-transplante (DEEG et al., 1996). O segundo fator é que a língua é o sítio anatômico mais freqüente de lesões malignas, seja em pacientes com AF, como em pacientes transplantados de medula óssea (KENNEDY; HART, 1982; CASTRO et al., 2000; KUTLER et al., 2003a; BYUN et al., 2008). Esta afinidade dos CEC na AF com a boca, principalmente a língua, é surpreendente, já que na população em geral a língua representa de 10% a 20% dos tumores de boca (KUTLER et al., 2003a).

O diagnóstico precoce de lesões com potencial de transformação neoplásica, bem como de neoplasias malignas permite tratamento menos agressivo, prognóstico melhor para o paciente e sobrevida maior. Portanto, a identificação das lesões com potencial de malignização e a intervenção adequada reduzem os índices de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias (EPSTEIN, ZHANG, ROSIN, 2002).

As células epiteliais orais do paciente que apresentou a leucoplasia não apresentaram infecção pelo HPV. No entanto, o DNA-HPV tem sido associado às lesões cancerizáveis. A média de detecção é de 22% em lesões leucoplásicas (MILLER; JOHNSTONE, 2001) bem como em 16% nas células adjacentes à lesão, em pacientes não portadores de AF (GIOVANNELLI et al., 2006). KUTLER et al. (2003c) detectaram DNA-HPV em 84% dos CEC de pacientes com AF, todavia as lesões displásicas e as áreas adjacentes aos tumores eram DNA-HPV negativas. Pode-se sugerir que a displasia oral precede a infecção pelo HPV na AF, em contraste com o que ocorre com a população em geral, principalmente na carcinogênese cervical, na qual o HPV precede a displasia cervical (LOWY; GILLISON, 2003). Certamente esta hipótese deve ser investigada pela análise de mais casos de lesões cancerizáveis e malignas em pacientes com AF. A escassez de relatos de casos ou estudos que abordem lesões cancerizáveis e os vários relatos e estudos de CEC oral na AF fazem pensar que: ou os mecanismos de transformação maligna são extremamente rápidos ou há uma falha no controle, acompanhamento e exame físico da boca nestes pacientes.

O controle do paciente com AF deve ser realizado 2 vezes ao ano por meio de um exame físico sistemático da boca e da orofaringe a partir dos 15 anos de idade. No entanto, em pacientes com história de leucoplasia ou lesões orais recorrentes recomenda-se o controle a cada 6-8 semanas. A identificação precoce do CEC oral, por conseguinte, intervenções terapêuticas em tempo adequado podem melhorar a sobrevida, ou ao menos reduzir a necessidade de tratamentos cirúrgicos agressivos (KUTLER et al., 2003a).

6.3 CITOLOGIA ESFOLIATIVA

A citologia em base líquida mostrou ser um método de coleta de células e material biológico da boca de fácil utilização e indolor ao paciente. A amostra do estudo foi formada por pacientes de diversas faixas etárias, mas principalmente por crianças, o que enfatiza a importância de utilizar técnicas que sejam bem aceitas pelos pacientes. O emprego da citologia esfoliativa é muito vantajoso e de fácil aplicação, em respeito a outras técnicas de biópsias convencionais (REMMERBACH et al., 2001). A técnica é simples, rápida, não agressiva ou invasiva, pode conferir um diagnóstico sensível e específico em grande parte dos casos, porém não tem grande popularidade na clínica odontológica (PEKTAS et al., 2006; NAVONE et al., 2007).

Não foi verificado nenhum material inadequado ou insatisfatório para a análise, isto é, classe 0 de Papanicolaou. Todas as lâminas obtidas apresentaram número suficiente de células, as quais eram bem representativas e permitiram adequada interpretação. A disposição em camadas homogêneas e a pouca quantidade de muco, inflamação e sangue, favoreceram também a posterior análise citomorfométrica. Estas são características e vantagens do emprego do método em base líquida (KUJAN et al., 2006).

A presença de inflamação nos esfregaços orais dos grupos experimentais I, II e III não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo IV. Este dado citológico não pôde ser associado com a avaliação clínica destes pacientes, isto é, a gengivite freqüentemente observada. O reduzido número de pacientes da amostra não permitiu mostrar esta associação com significância estatística.

A avaliação das lâminas, em todos os grupos, mostrou que poucas células apresentavam-se dobradas ou sobrepostas a outras células epiteliais. De acordo com o observado por outros autores, a morfologia das células epiteliais orais pode ser melhor avaliada pela citologia em base líquida do que pela citologia convencional (HAYAMA et al., 2005).

A disposição uniforme e não sobreposta das células epiteliais orais facilitou a realização da análise citomorfométrica. A possibilidade de realização de análises morfológicas e morfométricas computadorizadas nas células epiteliais orais aumenta

a acurácia diagnóstica (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988; COWPE, 1984; RAMAESH et al., 1999a).

A facilidade de uma única coleta de material biológico e realização de várias análises além da citologia, como os testes moleculares do DNA humano e a detecção do HPV, foi muito conveniente. A aplicação da citologia em base líquida é uma ferramenta útil para avaliação citomorfométrica, análises imunocitoquímicas da mucosa oral, detecção e estudos de prevalência do HPV, sejam na população normal ou de alto risco (KUJAN et al.; 2006). Pode ser usada como uma simples ferramenta que tem o potencial de mensurar o risco total da infecção pelo HPV na boca (SUMMERSGILL et al., 2001).

O sistema de citologia em base líquida utilizado neste estudo o DNA-CITOLIQ[®] (UCM) (Digene do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) permitiu o processamento citológico e a análise molecular. Foi demonstrado anteriormente que este sistema preserva adequadamente o material coletado permitindo a detecção do DNA-HPV por PCR. O adequado armazenamento e a padronização cuidadosa influenciam a qualidade do material para estas análises (NONOGAKI et al., 2004).

Ainda referindo-se ao sistema utilizado, a forma de coleta com escova (*cytobrush*) permitiu a obtenção de células de todas as camadas do tecido epitelial para a avaliação citológica e citomorfométrica. A adequada e correta coleta de amostras é mandatória para a obtenção de um diagnóstico preciso. Vários instrumentos têm sido utilizados na coleta de amostras para a citologia, como espátulas de madeira e metal, bastonetes de algodão e escovas. No entanto, as escovas têm se mostrado o melhor método de coleta de células epiteliais orais das camadas basal, intermediária e superficial, possibilitando, portanto a detecção de alterações precocemente (PEKTAS et al., 2006).

O papel da citologia não se restringe apenas à triagem primária do câncer oral, podendo também ser utilizada no monitoramento por longos períodos, de lesões orais, especialmente nos pacientes com história de lesões instáveis, isto é, períodos de exacerbação e remissão da lesão. A técnica pode ainda auxiliar o profissional a escolher a área e o tempo adequados para a realização de uma biópsia convencional (OGDEN; COWPE; WIGHT, 1997).

Os métodos de avaliação utilizados neste estudo objetivaram verificar se alterações citológicas estavam presentes na mucosa oral dos pacientes com AF. Para tal combinamos a técnica de citomorfometria com a investigação de fatores de risco ambientais, o HPV. A utilização de marcadores tumorais e celulares, a quantificação do DNA nuclear e o emprego de técnicas morfométricas e moleculares quando utilizados em complementação, permitem aumento da especificidade e sensibilidade do diagnóstico por meio da citologia. A aplicação isolada de técnicas quantitativas ou morfométricas não aumenta a capacidade diagnóstica da citologia esfoliativa oral. Não existe um marcador, único, presente em todos os carcinomas orais que não esteja presente na mucosa oral normal, portanto técnicas individuais, ou aplicadas isoladamente, são ferramentas insuficientes para o diagnóstico definitivo (OGDEN; COWPE; WIGHT, 1997).

As avaliações citomorfométricas têm melhorado com o emprego de análises computacionais e auxiliado o diagnóstico de lesões malignas. Sua importância é salientada pelo fato de que o diagnóstico não se restringe apenas à experiência do citopatologista e aos sinais e sintomas clínicos do paciente (PEKTAS et al., 2006).

As células do epitélio oral descamadas refletem mudanças dos tecidos adjacentes e das condições gerais do organismo, sejam fisiológicas ou patológicas. Desta forma, algumas alterações podem ser estudadas pela citologia esfoliativa. Nos casos de pacientes com diferentes tipos de anemias, as manifestações orais e os resultados de estudos citomorfométricos são abundantes na literatura. No entanto, não foram encontrados dados referentes à AF e AAS com relação à morfometria das células orais, seja com relação à anemia ou às lesões malignas.

Alterações displásicas que ocorrem em casos persistentes de anemia por deficiência de ferro, assim como na deficiência de ácido fólico e vitamina B12 podem ser estudados por métodos histopatológicos. Alterações anêmicas são refletidas na mucosa oral clínica e histologicamente normais (GURURAJ, SIVAPATHASUNDHARAM, SUMATHY; 2004).

Estudos dos efeitos da anemia nas células da mucosa oral mostram diferenças de acordo com o tipo de anemia encontrado. Todos os grupos experimentais deste estudo apresentaram aumento da NA estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Um aumento do tamanho do núcleo, na deficiência de vitamina B12, e o retorno ao normal após o tratamento são

amplamente citados na literatura (BOEN, 1957; NIEBURGS et al., 1962; BODDINGTON; SPRIGGS, 1959; BODDINGTON, 1959). Contudo, na anemia por deficiência de ferro o aumento do tamanho do núcleo da célula não é unanimidade, já que aumento do tamanho do núcleo (BODDINGTON, 1959; MONTO; RIZEK; FINE, 1961) ou ausência de alterações em seu diâmetro (RENNIE; MACDONALD; DAGG, 1984) foram relatados. Na anemia perniciosa e nas anemias megaloblásticas o aumento do núcleo de células epiteliais orais também é relatado (BOEN, 1957; BODDINGTON, 1959). O aumento da NA nos pacientes dos grupos transplantados I e III, que são em grande maioria não apresentam alterações hematológicas na série vermelha, mostra que esta alteração não está associada simplesmente ao quadro anêmico do paciente e não tem o mesmo comportamento que os outros tipos de anemias nutricionais. Isto sugere uma possível alteração genética, na qual o defeito associado às células epiteliais orais não é corrigido mesmo com a realização do TMO. Embora o TMO seja a única terapia capaz de promover a cura hematológica e corrigir a pancitopenia (ROSENBERG et al., 2005), a alteração na morfometria das células epiteliais orais não é corrigida.

Os grupos I e II, ambos AF, apresentaram aumento da CA em relação ao grupo IV. No entanto, o grupo III não apresentou diferença significativa da CA em relação ao grupo IV. Os dados da medida da CA nos variados tipos de anemia são contraditórios. Na anemia por deficiência de ferro as células esfoliadas da mucosa oral apresentaram redução significativa da CA (BODDINGTON, 1959; MONTO; RIZEK; FINE, 1961; GURURAJ; SIVAPATHASUNDHARAM; SUMATHY, 2004). Na anemia perniciosa foi observado aumento significativo do diâmetro do citoplasma (GRAHAM; RHEAULT, 1954; BOEN, 1957), e ainda foi observada uma tendência à diminuição da CA em comparação com pacientes saudáveis (BODDINGTON, 1959). Na AF constatamos que o aumento da CA também não mostrou estar associado ao quadro anêmico, visto que pacientes na grande maioria anêmicos (grupo II) e pacientes não anêmicos (grupo I) apresentaram igualmente alteração na CA.

Uma alteração da razão NA/CA foi observada nos grupos I e III, de forma que o grupo I apresentou diminuição e o grupo III aumento desta razão em comparação com o grupo IV. Vários tipos de anemias apresentam alteração na razão NA/CA (GRAHAM; RHEAULT, 1954; BODDINGTON, 1959; MONTO; RIZEK; FINE, 1961; GURURAJ; SIVAPATHASUNDHARAM; SUMATHY, 2004).

Embora os grupos I e III sejam transplantados e ao exame hematológico em sua maioria não apresentaram anemia, as alterações morfométricas foram relevantes. A avaliação morfométrica na anemia por deficiência de ferro antes, durante e depois do tratamento com ferro permitiu concluir que estas alterações celulares são reversíveis após a terapia (MONTÓ; RIZEK; FINE, 1961). O mesmo comportamento de retorno à normalidade é descrito em outras formas de anemias, como na perniciosa e na deficiência de vitamina B12 (GRAHAM; RHEAULT, 1954; BOEN, 1957; NIEBURGS et al., 1962; BODDINGTON; SPRIGGS, 1959; BODDINGTON, 1959). No entanto, ambos os grupos transplantados apresentaram alterações morfométricas na relação NA/CA, seja diminuição (grupo I) e aumento (grupo III). Este dado sugere que a relação NA/CA permanece alterada mesmo após o tratamento, diferentemente do que ocorre nas anemias por deficiências nutricionais.

Na AF, grupos I e II, observou-se aumento na área total da célula, já que a NA e a CA apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle. Este dado é relevante, principalmente levando-se em consideração que o grupo I é composto de pacientes já submetidos ao TMO, que é considerada a única modalidade de tratamento que permite a cura hematológica na AF. Na AAS apenas a NA apresentou alteração, enquanto que a CA apresentou dados semelhantes aos do grupo controle.

Algumas justificativas foram propostas para tentar explicar o mecanismo celular responsável por alterar as áreas do núcleo e do citoplasma nas anemias por deficiências nutricionais. No entanto, nas desordens hematológicas genéticas aqui estudadas este mecanismo não foi relatado previamente.

Na anemia megaloblástica ocorre uma anormalidade no metabolismo celular de natureza não completamente entendida, que ao mesmo tempo causa transformação nas células vermelhas precursoras, um gigantismo granular e anormalidades nucleares (BODDINGTON, 1959).

Na anemia por deficiência de ferro há redução no tempo de síntese do DNA e aumento da produção celular, que pode promover diminuição do tamanho das células epiteliais (RENNIE; MACDONALD; DAGG, 1984).

A vitamina B12 e o ácido fólico são co-fatores muito importantes necessários para a síntese do DNA. Na deficiência destes, alterações macrocíticas das células vermelhas, anormalidades de leucócitos e plaquetas, e alterações epiteliais, principalmente uma rápida divisão das células epiteliais da boca e trato gastrointestinal são esperados (LU; WU, 2004).

O aumento do diâmetro da célula pode ser explicado pelo fato de as células vermelhas normais resistem a um estresse oxidativo por numerosos sistemas de defesa anti-oxidantes. Ainda, o aumento no diâmetro do núcleo de células esfoliadas na anemia por deficiência de ferro pode ser devido a um distúrbio no processo de síntese do DNA (GURURAJ; SIVAPATHASUNDHARAM; SUMATHY, 2004).

O mecanismo que explique as alterações morfométricas na AF observadas em nossos resultados não pode ser elucidado por este estudo. É possível sugerir que um defeito genético também afete as células epiteliais orais, o qual não é corrigido pelo TMO.

Na avaliação citomorfométrica não foram levados em consideração o sexo e a idade do paciente, já que não foram descritas diferenças importantes na área total da célula para estes critérios. Não foi feita distinção quanto à localização da coleta do material porque esta abrangeu igualmente as várias regiões da boca. Um estudo quantitativo de células esfoliadas da boca obtidas de pacientes normais comparando a idade, o local de coleta e o sexo mostrou que não há diferenças significativas no volume da célula em relação ao envelhecimento do paciente, tendo sido detectada apenas variação na NA em pacientes jovens e aumento desta com a idade do paciente. Não são esperadas diferenças no volume da célula oral em relação ao sexo do paciente (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1985), bem como não são relatadas diferenças entre os sexos masculino e feminino para os valores NA e CA obtidos pela citologia esfoliativa em mucosa oral normal (RAMAESH et al., 1998).

Não foram observadas alterações morfológicas nucleares ou celulares nos esfregaços, sejam estas sugestivas de malignidade ou das anemias. Anormalidades nucleares como núcleos gigantes e binucleados foram descritas em células epiteliais orais em casos de anemias megaloblásticas, por deficiência de ferro e na anemia perniciosa (BODDINGTON, 1959).

Alguns estudos também abordaram a análise citomorfométrica em lesões cancerizáveis e malignas da boca. Apenas um caso de leucoplasia fez parte da amostra da presente pesquisa, e tal paciente apresentou aumento de NA e CA e diminuição da razão NA/CA em relação à média do seu grupo (I), porém sem significância estatística ($p \leq 0,05$).

A aplicação de técnicas quantitativas nos esfregaços citológicos de lesões orais suspeitas de alterações malignas mostrou resultados promissores. Lesões cancerizáveis e malignas podem ser detectadas com sucesso utilizando-se a análise citomorfométrica (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988).

Um significativo aumento na relação NA/CA devido a um aumento da NA e diminuição da CA em pacientes com lesões malignas orais foi relatado (COWPE, 1984). As lesões displásicas orais apresentam diminuição da CA em relação à mucosa oral normal, e esta diminuição é acentuada nas lesões malignas (RAMAESH et al., 1998). Sugeriu-se que a redução do diâmetro do citoplasma possa ser um indicativo precoce de alterações malignas (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988; RAMAESH et al., 1998). No entanto, a razão NA/CA não pode ser usada como critério para detectar células tumorais das não tumorais (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988; CARANTU; SCUTARIU; DOBRESCU, 2005).

A simplicidade e reprodutibilidade das técnicas quantitativas têm grande valor no monitoramento de lesões suspeitas bem como no acompanhamento pós-cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico. A padronização destas técnicas pode reduzir a necessidade de realização de múltiplas biópsias em pacientes de alto risco que requerem acompanhamento clínico constante (COWPE; LONGMORE; GREEN, 1985).

6.4 DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DO HPV

A coleta da células do tecido epitelial oral, como mencionado anteriormente, também permitiu a detecção do HPV, que é um vírus essencialmente epiteliotrófico. O raspado superficial de células da boca tem sido utilizado com sucesso pela

capacidade representativa de células epiteliais, além de permitir a detecção de agentes virais como o HPV (GIOVANNELLI et al., 2002; SMITH et al., 2004a; GIOVANNELLI et al., 2006).

A avaliação do DNA das células epiteliais orais é uma fonte promissora para avaliar o risco da infecção pelo HPV em carcinomas em região de cabeça e pescoço, principalmente na AF. Tal análise pode ajudar a elucidar os mecanismos e a participação do vírus na carcinogênese oral através de estudos em pacientes sem lesões, com infecção persistente e pacientes que desenvolvem lesões malignas.

A realização de coletas periódicas nos pacientes com AF, que são de alto risco para malignidade, é muito interessante para o controle e acompanhamento. O potencial para realização da triagem e detecção iniciais e a indicação nos estudos de prevalência de agentes virais e doenças correlatas é apontado na literatura (KUJAN et al.; 2006).

A importância da detecção do HPV nas células epiteliais orais tem sido enfatizada pela possível associação deste vírus à carcinogênese oral. Vários estudos têm procurado demonstrar e esclarecer os mecanismos e o papel do vírus nos CECs orais (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000; MILLER; JOHNSTONE, 2001; HERRERO et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2003; SMITH et al., 2004a; SMITH et al., 2004b; GILLISON et al., 2008).

Embora a atuação do HPV na carcinogênese oral seja menos evidente do que na região cervical, foi sugerido que o vírus tem participação importante em um determinado grupo de carcinomas orais (GILLISON et al., 2008). Foi proposta a explicação da infecção pelo HPV ser estrita ao tecido epitelial, a replicação do DNA viral e a subsequente formação das partículas virais nas células epiteliais da pele, mucosa anogenital e oral pode expor estas a infecções por uma menor interferência imunológica. A ausência de interações imunológicas poderia ser a razão principal da infecção no tecido epitelial, permitindo a adaptação de novas variantes do HPV aos diferentes tipos de epitélio (Zur HAUSEN, 2000).

A detecção dos mesmos genótipos de HPVs de alto risco em células esfoliadas da boca e em áreas de carcinomas orais do mesmo paciente indicam que a presença contínua destes vírus é necessária no processo de carcinogênese, como no modelo cervical. Esta teoria reforça a necessidade e indicação da coleta de

células orais por meio da citologia para a pesquisa do HPV, podendo ser um marcador biológico precoce (SMITH et al., 2004b).

A realização de estudos de detecção do HPV em pacientes de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas, como na AF, é de grande importância e relevância. A necessidade de realizar a detecção para o HPV na mucosa oral em pacientes de alto risco, como fumantes e etilistas, têm sido abordada, principalmente levando-se em consideração as estratégias de tratamento (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

A hipótese da participação do HPV na carcinogênese na AF foi apontada recentemente (LOWY; GILLISON, 2003; KUTLER et al., 2003b; KUTLER et al., 2003c; SPARDY et al., 2007), porém não é unânime a hipótese de que o HPV tenha participação nos CEC da região de cabeça e pescoço na AF. A avaliação de uma amostra com poucos casos sugeriu que o HPV não estava envolvido na gênese dos tumores considerados. No entanto, nos casos de integração do vírus ao genoma do hospedeiro, o DNA-HPV pode não ser detectado, ou quando as seqüências utilizadas na PCR não são específicas e o subtipo presente nestes casos poderia não ter sido identificado pelos *primers* e sondas utilizados (VAN ZEEBURG et al., 2004; VAN ZEEBURG et al., 2005). Apesar de KUTLER et al. (2003a) terem detectado o HPV em 83% dos CEC na região de cabeça e pescoço, o vírus não foi detectado nas áreas adjacentes aos tumores ou nos tecidos displásicos tumorais.

Os estudos disponíveis avaliaram amostras pequenas de pacientes com AF e CEC, o que difere do presente estudo que avaliou a presença do HPV nas células epiteliais orais na ausência de neoplasias malignas. Na população em geral, a presença do HPV em mucosa clinicamente normal deve ser considerada de grande valor clínico e sugere um adequado acompanhamento destes pacientes (GIOVANNELLI et al., 2006).

Avaliamos pontualmente a presença do HPV oral nos grupos estudados, todavia é ressaltada a necessidade de posteriores análises e acompanhamento do paciente para o esclarecimento do processo de infecção viral e se há participação deste na carcinogênese oral. Foi demonstrado anteriormente que a infecção pelo HPV em orofaringe pode preceder em 10 anos ou mais o desenvolvimento da neoplasia (MORK et al., 2001).

Não foi possível realizar um confronto entre as prevalências do HPV encontradas nos grupos experimentais I, II e III com dados prévios, pois não existem, até o momento, estudos semelhantes. Realizamos um estudo de prevalência do HPV nas células epiteliais orais de pacientes com AF, submetidos e não submetidos ao TMO, bem como em pacientes com AAS transplantados de medula óssea. Foi observada maior prevalência do HPV nestes três grupos experimentais em relação ao grupo controle saudável. Os grupos I e III, ambos representados por pacientes submetidos ao TMO, apresentaram maior detecção do HPV, que foi estatisticamente significativa. Dados semelhantes, de elevada prevalência de HPV em CEC oral, foram encontrados em pacientes transplantados de órgãos e de medula óssea. Os HPVs-16 e 18 foram detectados em 2 de 3 pacientes submetidos ao TMO. Foi sugerido que a infecção pelo HPV tem uma importante participação no desenvolvimento do CEC oral em pacientes transplantados devido à imunossupressão crônica comum nestes pacientes. Outro fator a ser considerado nos pacientes transplantados é o desenvolvimento da DECH crônica, que freqüentemente causa lesões ulceradas que facilitam a entrada do vírus na mucosa oral, acelera o *turn over* celular e aumenta a probabilidade de dano genético pelo agente carcinogênico viral (ZHANG et al., 2002).

Não está claro se a elevada prevalência do HPV e a inter-relação com o sistema imunológico no combate à infecções em pacientes com AF. Como mencionado anteriormente em relação à candidose, apesar da citopenia, os pacientes com AF não apresentam grandes dificuldades em controlar infecções em geral (LOWLY; GILLISON, 2003).

Os elevados índices de HPV em CEC na AF podem ser devidos a uma possível disfunção imune ou estarem relacionados ao mecanismo de defeito do DNA (KUTLER et al., 2003c). É consenso entre vários autores que o papel da imunodeficiência, característica na AF, é crucial no desenvolvimento de neoplasias malignas (PASQUINI et al. 2003; KUTLER et al., 2003b). A imunossupressão associada à persistente falência medular e à instabilidade genética podem predispor o paciente a infecções virais e possivelmente à incorporação do DNA viral ao genoma da célula (KUTLER et al., 2003b). Deve-se ressaltar ainda o relevante papel da terapia imunossupressiva prévia ao TMO, seja na AF como na AAS, como fator de risco, que paradoxalmente aumenta a incidência de neoplasias (DEEG et al.,

1996; SOCIÉ et al., 1998; KOLB et al., 1999). A elevada prevalência do HPV encontrada neste estudo nos pacientes transplantados de medula óssea, enfatiza ainda mais o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas e invoca a necessidade de um rigoroso acompanhamento do paciente.

Análises moleculares sugerem que o mecanismo do CEC oral em pacientes transplantados seja semelhante ao dos pacientes não transplantados e que o HPV é um importante agente causal na carcinogênese pós-transplante. Importantes implicações clínicas no controle do paciente transplantado devem ser levadas em consideração (ZHANG et al., 2002).

O aperfeiçoamento das técnicas de TMO ao longo dos últimos anos tem permitido aumentar a sobrevida dos pacientes com doenças hematológicas (NETO, 1999). Conseqüentemente, pode-se esperar um aumento do número de pacientes transplantados, sobrevida maior e maior número de pacientes com potencial de desenvolver tumores malignos. Desta forma, é extremamente importante identificar precocemente fatores de risco, manifestações clínico-patológicas destas lesões e compreender os mecanismos envolvidos na carcinogênese.

Foi demonstrado que mesmo que novos protocolos de TMO sejam criados e que estes possibilitem redução na incidência de CEC, espera-se ainda que 50% ou mais dos pacientes com AF desenvolvam CEC ou outro tumor sólido aos 40 anos de idade. Evidentemente, novas intervenções são necessárias para reduzir a incidência destes tumores em pacientes submetidos ou não ao transplante, como a possível suscetibilidade à carcinogênese induzida pelo HPV (ROSENBERG et al., 2005).

Para o presente estudo foi estabelecido um tempo mínimo de TMO de 3 anos. Este critério foi adotado baseado na suscetibilidade aumentada em desenvolver tumores após o TMO, que é agravada com o passar do tempo. Adicionalmente, após 3 anos, os efeitos agudos do TMO, como a DECH são mais raros, poderiam interferir na análise citológica e do HPV, além de atuarem como fatores de que levariam a um diagnóstico equivocado. A incidência de tumores sólidos aumenta significativamente em pacientes que realizam TMO e é influenciada pelo tempo transcorrido (SOCIÉ et al., 1993). O risco em desenvolver CEC aumenta 4,7% por ano após o TMO e a incidência acumulativa de 15 anos após o TMO é de 24% (ROSENBERG et al., 2005). É válido ressaltar que este critério estabelecido restringiu enormemente o número de pacientes possíveis de participação em nosso estudo. Em geral, os

pacientes comparecem assiduamente às consultas de controle até o segundo ano após o TMO. A partir deste os retornos são menos freqüentes e alguns pacientes têm dificuldades em comparecer às consultas médicas.

Ao analisar a prevalência do HPV nos grupos estudados, além do tempo de TMO, foi levada em consideração a idade dos pacientes. O grupo III apresentou detecção significativamente maior de HPV que o grupo IV, e como demonstrado nos resultados o risco relativo é influenciado pela idade dos pacientes (média de idade do grupo III = 34 anos, e grupo IV = 16 anos). Estes dados permitem traçar um paralelo com estudos realizados incluindo pacientes com CECs orais. Uma maior prevalência de HPV foi observada em pacientes de até 40 anos de idade, enquanto que em pacientes entre 40 e 60 anos observou-se menor prevalência deste vírus (CRUZ et al., 1996). Dados semelhantes também foram mostrados por SMITH et al. (2004b), enfatizando uma prevalência maior do HPV em CEC oral em pacientes com idade inferior a 55 anos. Estes autores correlacionaram a maior prevalência ao comportamento sexual, como a prática de sexo oro-anal e oro-genital reforçando a transmissão através do contato físico direto. Infelizmente, não foram encontrados estudos que envolvessem pacientes com média de idade semelhante à dos grupos experimentais (média geral = 17,5 anos) para se realizar o devido confronto, visto que os CECs orais na população em geral têm um pico de incidência na quinta década de vida (CASTRO et al., 2000). No entanto, pode-se especular que pacientes na terceira década de vida, sexualmente ativos, sejam mais acometidos pela infecção pelo HPV.

O risco de infecção pelo HPV é significativamente influenciado pela idade do paciente não somente em lesões orais malignas como também nas lesões cancerizáveis (GIOVANNELLI et al., 2002). A menor prevalência do HPV em pacientes mais jovens, grupos II e controle, mostra dados semelhantes com dados da literatura de prevalência do HPV em crianças. O DNA-HPV foi detectado em 6% em crianças e adolescentes de até 20 anos de idade. Crianças menores do que 6 anos tiveram maior prevalência de HPV do que adolescentes acima de 13 anos. Em adultos a freqüência do HPV oral encontrada foi de 11%, que pode ser explicada pela exposição cumulativa ao vírus durante à vida somada à atividade sexual, à qual as crianças não são normalmente expostas (SUMMERSGILL et al., 2001). A presença do HPV em carcinomas da orofaringe está associada ao número de

parceiros sexuais e tempo de início e tipo de atividade sexual praticada (sexo oral e/ou genital). Desta forma, observa-se prevalência mais acentuada do HPV em pacientes adultos, com maior número de parceiros e iniciação precoce da atividade sexual (D'SOUZA et al., 2007).

Não somente a prevalência elevada do HPV tem relevância, mas principalmente os genótipos encontrados. Neste estudo, nos três grupos experimentais, os HPVs de alto risco (HPV-16, 18 e 58) foram os mais freqüentemente detectados. Um dado extremamente importante é a elevada prevalência dos HPVs de alto risco, HPV-16 e 18 (71,42%) nos pacientes com AF transplantados. A identificação e tipificação do papilomavírus humano são de relevância clínica no manejo do paciente (GIOVANNELLI et al., 2004). A informação do tipo específico do HPV ajuda a entender a história natural e a biologia do vírus, especificamente no contexto atual da vacinação contra o HPV (SAFAEIAN et al., 2007). É relevante salientar que os HPV-16 e 18 são os genótipos mais comumente encontrados em lesões cancerizáveis e malignas da boca (CRUZ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2003; MILLER; JOHNSTONE, 2001), no entanto nossa amostra foi constituída de pacientes sem lesões orais malignas. Na região cervical, estes genótipos também são detectados na grande maioria dos carcinomas (zur HAUSEN, 2000; SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000; MUÑOZ et al., 2003). O HPV-16 está associado a um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasia da orofaringe (D'SOUZA et al., 2007). O HPV-18 é o genótipo mais freqüentemente encontrado em lesões orais cancerizáveis e malignas (GIOVANNELLI et al. 2006).

Um paciente, do grupo I apresentou uma infecção dupla pelos HPVs de alto risco 16 e 18. Existe relevância sob o ponto de vista da carcinogênese a co-infecção por múltiplos HPVs, já que a presença de mais de um tipo de HPV tende agravar a severidade da doença (BURD, 2003). Infecção dupla pelos HPVs 16 e 18 também foi detectada em casos de carcinomas orais em pacientes transplantados (ZHANG et al., 2002). As infecções múltiplas pelos HPVs 16 e 18 representam 1,7% dos casos de CEC oral detectados na população em geral (KREIMER et al., 2005).

O único genótipo de baixo risco encontrado neste estudo foi o HPV-6, e em igual freqüência nos grupos estudados I, II e III (1 caso em cada grupo). A maioria dos estudos aborda a tipificação do HPV em lesões malignas, e os dados específicos com respeito ao HPV-6 em mucosa oral normal são escassos. Os

genótipos de HPV mais freqüentemente encontrados tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com lesões orais são: HPV-6, 11, 16 e 18 (OLIVEIRA et al., 2003; OSTWALD et al., 1994; SMITH et al., 2004a; SYRJÄNEN; SYRJÄNEN; HAPPONEN, 1988, MILLER; JOHNSTONE, 2001). A detecção de HPVs de baixo risco em carcinomas orais é menos freqüentemente relatada do que os HPVs de alto risco (MILLER; JOHNSTONE, 2001; SMITH et al., 2004a). O HPV-6 representa 3,1% dos tipos encontrados nos CECs orais (KREIMER et al., 2005).

A prevalência aumentada do HPV, bem como a identificação dos genótipos específicos nestes grupos de pacientes estudados pode implicar em novos rumos em pesquisa e ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na carcinogênese. Algumas implicações em estratégias de prevenção e tratamento de lesões associadas também poderão ser consideradas, como as vacinas para determinados tipos de HPV.

Estudos epidemiológicos com análises moleculares enriqueceram muito o conhecimento da participação da infecção pelo HPV como causa de neoplasias cervicais, de forma que algumas mudanças na triagem, na prevenção e na vacinação têm sido propostas. A prevenção da infecção pelo HPV pela vacinação é mais interessante do que o tratamento de lesões cancerizáveis e neoplasias, e com isto é esperada uma redução da morbidade e mortalidade associada à infecção viral (TROTIER; FRANCO, 2006). Uma nova perspectiva pode ser vista com relação à carcinogênese oral na população em geral e em grupos específicos de pacientes, como na AF. O impacto da vacina contra o HPV em tumores de cabeça e pescoço e ginecológicos é esperado com muito interesse na AF (ALTER, 2007).

As vacinas terapêuticas objetivam eliminar a infecção existente, prevenir a formação e progressão de lesões, regredir ou eliminar lesões existentes de qualquer grau, incluindo carcinomas invasivos. A vacina terapêutica deve estimular uma resposta imune capaz de eliminar lesões virais infectadas e induzidas. Esta abordagem envolve resposta imune celular específica utilizando vários antígenos como alvo (DEVARAJ; GILLISON; WU, 2003). Sob o ponto de vista clínico a vacinação parece opção promissora. No entanto, alguns estudos ainda devem ser conduzidos previamente e analisados com cautela, visto que o sistema imunológico na AF pode estar comprometido.

6.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV

A identificação do HPV em amostras de células orais na ausência de lesões malignas exigiu a associação de mais de uma técnica molecular. Empregamos diversas metodologias para a detecção e tipificação do HPV nos pacientes da amostra. Certamente não foi objetivo realizar um confronto dos diferentes métodos utilizados, mas sim obter um resultado sensível e específico.

Na população em geral, a revisão da literatura mostrou que existem diferenças nas taxas de prevalência relatadas para o CEC oral que podem ser explicadas pela utilização de abordagens técnicas diferentes ou populações de estudos heterogêneas (CRUZ et al., 1996). Utilizamos técnicas moleculares empregando a reação em cadeia da polimerase, que são altamente sensíveis e permitem um diagnóstico confiável.

A maioria das amostras foi negativa utilizando-se o par de *primers* MY09/MY11, mesmo sendo tipificadas posteriormente com outros sistemas. Este resultado negativo pode estar relacionado à sensibilidade da PCR convencional e também ao comprimento do alvo, visto que o fragmento a ser copiado com este par de *primers* tem um comprimento grande e o DNA pode estar fragmentado, o que dificulta a amplificação da sequência específica (HUSNJAK et al., 2000). A sensibilidade e especificidade dos métodos de PCR variam dependendo principalmente do par de primers, do tamanho do produto da PCR, das condições da reação, da eficiência da enzima DNA polimerase utilizada, do espectro de HPVs amplificado, da habilidade em detectar múltiplos tipos e da disponibilidade de realização de um teste tipo-específico (IARC, 2007).

Foi detectado um número maior de amostras positivas para o HPV quando empregamos a *nested* PCR. A utilização de apenas um par de *primers* na detecção viral subestima a presença do DNA-HPV, enfatizando a indicação de uma *nested* PCR, na qual ocorre uma segunda amplificação de um produto menor (BAAY et al. 1996, HUSNJAK et al., 2000). Embora alguns autores não recomendem a *nested* PCR como rotina de diagnóstico da infecção por HPV por ser um procedimento pouco prático e mais suscetível à contaminação. Porém, ela tem se mostrado efetiva com padrão de alta sensibilidade quando realizada em condições apropriadas para

prevenir contaminação (GIOVANNELLI et al., 2004). Não foi observada, de maneira geral, contaminação em nossos experimentos, pois os géis de agarose não revelaram produtos inespecíficos importantes com a realização da *nested* PCR.

A realização de uma *nested* PCR usando o par de *primers* GP5+/GP6+ após a primeira com MY09/MY11 aumentou a eficiência em detectar HPVs. Isto é explicado pelo tamanho do produto amplificado, pois produtos menores são mais eficientemente amplificados, ressaltando-se ainda o fato que os *primers* GP não apresentam bases degeneradas como MY, como relatado anteriormente (HUSNJAK et al., 2000, EVANDER et al., 1992).

A *nested* PCR com *primers consensus* aumenta a sensibilidade de detecção do HPV. A detecção do HPV utilizando MY e/ou GP (PCR de uma única etapa) é menor do que quando se utiliza os mesmos *primers* realizando-se uma *nested* PCR (em duas etapas) (EVANDER et al., 1992). O aumento na detecção de HPV em *nested* PCR deve ser avaliado com cautela, pois pode haver amplificação não específica (EVANDER et al., 1992). No entanto, ao realizar a análise das amostras por meio de um gel em eletroforese o produto de amplificação correspondia ao tamanho esperado.

As amostras avaliadas neste estudo não apresentavam lesões malignas, como mencionado anteriormente, portanto a quantidade de vírus esperada era baixa. A *nested* PCR MY/GP aumenta significativamente a detecção do DNA-HPV, indicando que este método é altamente apropriado para amostras com baixo número de cópias virais (HUSNJAK et al., 2000; EVANDER et al., 1992).

A grande vantagem em utilizar *consensus primers* está na detecção de um grande número de HPVs, tipos conhecidos e desconhecidos. Se apenas *primers* tipo-específicos tivessem sido utilizados haveria uma subestimação dos casos positivos (HUSNJAK et al., 2000).

Além da realização da detecção do HPV com *primers consensus* utilizamos outros dois sistemas (INNO LiPA e Digene Consensus High risk) que possibilitaram a tipificação das amostras positivas. A desvantagem dos pares de *primers* MY09/MY11 e GP5+/GP6+ é o comprimento relativamente grande, principalmente para as amostras de DNA fragmentado. Nestes casos os *primers* SPF, utilizados no sistema INNO LiPA, permitem a amplificação de um fragmento de apenas 65pb, o

que torna o sistema altamente sensível e de amplo espectro de detecção (KLETER et al., 1998).

A elevada sensibilidade da PCR realizada com os *primers* SPF em combinação com o sistema LiPA é relevante nos casos de pequenas quantidades de vírus, como em pacientes desta amostra, sem lesões orais. A importância de uma técnica de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da infecção por HPV em pacientes sem lesões é crucial e tem implicações na seleção e acompanhamento dos pacientes (KLETER et al., 1999). O potencial de detecção do HPV de diferentes testes pode variar pelas diferenças na sensibilidade analítica, hibridização cruzada com outros genótipos e falha em detectar variantes específicas (GILLIO-TOS et al., 2006).

Não foi objetivo deste trabalho realizar uma comparação entre os métodos de tipificação do HPV, mas alguns comentários podem ser feitos na diferença de detecção entre os sistemas Digene Consensus High risk e INNO LiPA. O sistema INNO LiPA não detectou uma infecção dupla (HPV 16 e 18), uma infecção pelo HPV-18 e 3 infecções pelo HPV-16 que foram diagnosticadas pelo sistema Digene. Isto poderia ser explicado por uma pequena variação na sonda utilizada por estes diferentes sistemas ou por uma competição do produto amplificado entre as sondas específicas para o HPV e as do DNA humano DPB1 – HLA (no sistema INNO LiPA). Outra hipótese a ser considerada é a possibilidade de variantes dos tipos de HPVs, que poderiam ser detectadas de maneira mais eficaz por um sistema em detrimento do outro. Devemos levar em consideração que o sistema Digene Consensus High risk prevê a realização de uma *nested* PCR para amostras com baixas quantidades de DNA, enquanto que o sistema INNO LiPA não o faz. Ainda, os *consensus primers* SFP10 têm o potencial de amplificar 54 tipos diferentes de HPV em uma reação de PCR. No entanto, sua sensibilidade analítica, especialmente na presença de múltiplos tipos de HPV com diferentes cargas virais pode ser reduzida, quando diferentes tipos virais competem com uma quantidade limitada de *primers* (SAFAIEN et al., 2007). A discordância de vários tipos de metodologias em detectar infecções múltiplas pelo HPV é maior do que em infecções únicas (GILLIO-TOS et al., 2006).

Apesar da grande vantagem de alta especificidade, a alta estringência da hibridização reversa requer que todas as variantes de um certo tipo de HPV apresentem uma perfeita ligação com a sonda, um único ponto de falha representa a

não detecção deste HPV. Embora as sondas tendam a se ligar perfeitamente com todas as variantes do HPV conhecidas, não é possível excluir que uma sutil variação na sequência prejudique a hibridização (VAN DEN BRULE et al., 2002).

Embora o seqüenciamento seja a única metodologia potencialmente capaz de identificar todos os tipos e variantes do HPV presentes em um espécime biológico (VERNON; UNGER; WILLIAMS, 2000), não foi possível identificar o genótipo do HPV em 6 amostras. Esta metodologia é trabalhosa e requer a utilização de equipamentos apropriados (IARC, 2007). A impossibilidade de tipificar o genótipo pela análise das seqüências ao eletroferograma provavelmente foi devida à baixa quantidade de vírus. Durante o processo de purificação há perda da quantidade do DNA, o que agrava ainda mais a situação nestes casos. Além disso, nas infecções múltiplas o seqüenciamento direto é de indicação limitada quando se utiliza *primers consensus* para amplificação do DNA, são relatadas limitações da técnica em identificar amostras com múltiplos HPVs. Nestes casos, métodos de hibridização reversa ou *line blot* devem ser empregados como complementação (VERNON; UNGER; WILLIAMS, 2000; GIOVANNELLI et al., 2004; IARC, 2007).

A utilização de *nested* PCR MY/GP seguida de seqüenciamento direto do DNA viral ou tipificação com sistema de hibridização reversa nos casos de infecções múltiplas é indicada em lesões orais. A hibridização reversa é realizada nos casos de suspeita de múltiplos HPVs quando analisado o eletroferograma obtido no seqüenciamento (GIOVANNELLI et al. 2006). O método de hibridização reversa permite simultânea e precisa detecção de múltiplos tipos de HPVs com sensibilidade maior que a análise do seqüenciamento, já que este muitas vezes não revela a presença de múltiplos genótipos (KLETER et al., 1999).

Alguns autores têm enfatizado que carga viral está diretamente correlacionada com a severidade da doença, assim como os genótipos de alto risco (BURD, 2003). Baixa carga viral está associada a um baixo risco de desenvolvimento de lesões displásicas e malignas (IARC, 2007). Desta forma, procuramos quantificar a carga do vírus presente nas amostras deste estudo.

As 9 amostras HPV-16 positivas foram analisadas através da PCR em tempo real para quantificação da carga viral. Utilizou-se uma sonda para beta globina e uma sonda HPV-E6 seguindo o protocolo descrito por VAN DUIN et al. (2002) e PEITSARO, JOHANSSON, SYRJÄNEN (2002), respectivamente.

O método de PCR quantitativa utiliza sondas fluorescentes que se ligam ao DNA de fita dupla em cada ciclo permitindo quantificar o DNA presente. A liberação da fluorescência a cada ciclo de amplificação é diretamente proporcional a quantidade de produto amplificado, e portanto considerada um método preciso em estimar a carga viral (HA; CALIFANO, 2004; IARC, 2007). A quantificação da carga viral permite estabelecer um limiar de significância da infecção viral (HA; CALIFANO, 2004).

Apenas 2 amostras foram positivas utilizando a sonda E6. A carga viral encontrada nas amostras 39 e 66 está descrita no Apêndice H. Isto pode ser explicado devido à baixa concentração do DNA viral, já que para a realização da detecção do HPV foi realizada a *nested* PCR, o que não pode ser feito na avaliação quantitativa. Pela quantificação das duas amostras observa-se que a carga viral apresentava grandeza de 10^1 . A curva padrão utilizada na reação (genoma completo do HPV-16) apresenta um alcance de 10^2 a 10^6 cópias do vírus, demonstrando que mesmo abaixo do alcance o sistema de PCR forneceu dados referentes à quantificação. HA et al. (2002) avaliaram lesões orais e também encontraram amostras de DNA-HPV positivas utilizando-se a técnica de PCR convencional e que estavam abaixo do limiar de detecção na PCR quantitativa.

É evidente que as principais complicações na AF, que representam o maior desafio, são o desenvolvimento de neoplasias malignas em idade precoce. A identificação de pacientes de elevado risco e fatores associados pode representar um progresso na abordagem, no manejo e no controle dos pacientes.

A citologia é uma técnica não utilizada com grande frequência na Odontologia em comparação com a Medicina, mais especificamente a Ginecologia. Várias melhorias no modo de coleta do material, como a utilização de escovas apropriadas para uso em boca, o emprego do meio em base líquida e a associação de técnicas moleculares e morfométricas, têm permitido aumentar a sensibilidade e a especificidade diagnóstica. A avaliação inicial e o monitoramento de pacientes de elevado risco para o desenvolvimento de neoplasias podem ser facilmente realizados utilizando a citologia em base líquida. Este método tem a grande vantagem de prover resultados que podem ser padronizados. A utilização da citologia deve ser vista como um exame de primeiro nível, capaz de identificar células displásicas ou alterações moleculares.

A maior prevalência do HPV nos pacientes estudados, principalmente transplantados de medula óssea, indica a necessidade de um acompanhamento rigoroso da mucosa oral para a identificação de possíveis agentes carcinogênicos e detecção precoce de alterações clínicas. Novas estratégias de prevenção de carcinomas orais devem ser consideradas, principalmente neste momento de implementação da vacinação contra o HPV em todo o mundo.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permitiu as seguintes conclusões:

- A avaliação por meio do exame físico não mostrou lesões malignas nos pacientes com AF.
- Pacientes com AF não apresentam alterações morfológicas características de malignidade de acordo com os critérios de Papanicolaou.
- Pacientes com AF apresentam alterações morfométricas nas células epiteliais orais.
- Pacientes com AF têm alta prevalência de HPV, principalmente o HPV-16.
- Estes achados justificam acompanhamento freqüente destes pacientes para a detecção precoce de neoplasias malignas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS²

Açıkgöz A , Ozden FO, Fisgin T, Açıkgöz G, Duru F, Yarali N, et al. Oral and dental findings in Fanconi's Anemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;22(6):531-9.

Alberti S, Spadella CT, Francischone TRCG, Assis GF, Cestari TM, Taveira LAA. Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometric. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(9):538-43.

Altay C, Alikasıfoglul M, Kara A, Tunçbilek E, Ozbek N, Schroeder-Kurth TM. Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplastic anemia (Fanconi anemia and non-Fanconi anemia) Hacettepe experience. *Clin Genet*. 1997;51(5):296-302.

Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;2007:29-39.

Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation and cancer. *Pediatr Transplantation* 2005;9(7):81-86.

Anelli A. Transplante de Medula Óssea. Ensaios do Hospital do Câncer A. C. Camargo. [Acesso em 2005 jan 28]. Disponível em: <http://www.hcanc.org.br/outrasinfs/ensaios/tmons.html>

Araujo MR, Oliveira Ribas M, Koubik AC, Mattioli T, Lima AAS, França BHS. Fanconi's anemia: clinical and radiographical oral manifestations. *Oral Dis*. 2007;13(3):291-5.

Atalay F, Taskiran C, Taner MZ, Pak I, Or M, Tuncer S. Detection of human papillomavirus DNA and genotyping in patients with epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(6):823-8.

Baay MFD, Quint WGV, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MPM, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer-pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*. 1996;34(3):745-7.

Baker KS, Gurney JG, Ness KK, Bhatia R, Forman SJ, Francisco L, et al. Late effects in survivors of chronic myeloid leukemia treated with hematopoietic cell transplantation: results from Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood*. 2004;104(6):1898-1906.

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

Boddington MM, Spriggs AI. The epithelial cells in megaloblastic anaemias. *J Clin Pathol*. 1959;12(3):228-34.

Boddington MM. Changes in buccal cells in the anaemias. *J Clin Pathol*. 1959; 12(3):222-227.

Boen ST. Changes in the nuclei of squamous epithelial cells in pernicious anaemia. *Acta Med Scand*. 1957;159(6):425-31.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996;56(20):4620-24.

Brennan MT, Sankar V, Baccaglini L, Pillemer SR, Kingman A, Nunez O. Oral manifestations in patients with Aplastic Anemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2001;92(5):503-8.

Broadstock M. Liquid-based cytology – an alternative view. *Cytopathol*. 2001;12(3):141-3.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17.

Byun JH, Park BW, Kim JR, Lee GW, Lee JH. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplant and graft-versus-host disease: a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(1):144-7.

Campagnoli EB. *Comparação entre a citologia em base-liquída e a citologia convencional no diagnóstico de carcinomas bucais [dissertação]*. Curitiba (PR): Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2003.

Carantu ID, Scutariu MM, Dobrescu G. Computerized morphometric discrimination between normal and tumoral cells in oral smears. *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):160-8.

Carvalho G. *Citologia Oral*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2002.

Castro AL, Castro AL, Moraes NP, Furuse TA. *Estomatologia*. 3 ed. São Paulo: Editora Santos; 2000.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J R Soc Med*. 1985;78(12):995-1004.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J R Soc Med* 1988;81(9):509-13.

Cowpe JG. Quantitative exfoliative cytology of normal and abnormal oral mucosal squames: preliminary communication. *J R Soc Med*. 1984;77(11):928-31.

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.

D'Andrea AD, Grompe M. Molecular Biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood*. 1997;90(5):1725-36.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1944-56.

De La Rosa-García E, Bologna-Molina R, Veja-González MTJ. Graft-versus-host disease, an eight case report and a literature review. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 2006;11(6):486-92.

De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol*. 2007;38(1):7-13.

De Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *J Gen Virol*. 1995;76(4):1057-62.

Deeg HJ, Socié G, Schoch G, Henry-Amar M, Witherspoon RP, Devergie A, et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood*. 1996;87(1):386-92.

Devaraj K, Gillison ML, Wu TC. Development of HPV vaccines for HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(5):345-62.

Digweed M. Molecular Basis of Fanconi's anemia. *Klin Padiatr*. 1999;21(4):192-7.

Diversi HL, Griffin JW, Payne T. Correlation of cytologic nuclear changes to anemias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;21(3):341-6.

Dokal I. Fanconi anemia is a highly penetrant cancer susceptibility syndrome. *Haematologica*. 2008;93(4):486-9.

Dokal I. The genetics of Fanconi's anaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13(3):407-25.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *JCDA*. 2002;68(10):617-21.

Evander M, Edlund K, Bodén E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol*. 1992;30(4):987-92.

Ferry C, Socié G. Bone marrow transplantation for leukemia: long term outcome. *Bull Cancer*. 2003;90(7):601-6.

Freitas MD, García AG, Abelleira AC, Carneiro JLM, Rey JMG. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Med Oral*. 2004;9:355-61.

Garland SM, Tabrizi S. Methods for HPV detection: polymerase chain reaction assays. *Science Pract*. 2006;1:63-72.

Gasparini G, Longobardi G, Boniello R, Di Petrillo A, Pelo S. Fanconi anemia manifesting as a squamous cell carcinoma of the hard palate: a case report. *Head Face Med*. 2006;13(2):1.

Gillio-Tos A, De Marco L, Ghisetti V, Snijders PJF, Segnan N, Ronco G, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/GP6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol*. 2006;36(2):126-32.

Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factors profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *JNCI*. 2008;100(6):407-20.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709-20.

Giovannelli L, Campisi G, Colella G, Capra G, Di Liberto C, Caleca MP, et al. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther*. 2006;10(1):49-55.

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.

Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Aricò P, Ammatuna P. Detection of Human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the Hybrid Capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3861-4.

Graham RM, Rheault MH. Characteristic cellular changes in epithelial cells in pernicious anemia. *J Lab Clin Med*. 1954;43(2):235-45.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):3020-7.

Gururaj N, Sivapathasundharam B, Sumathy N. Cytological findings in iron deficiency anemia. *Indian J Dent Res*. 2004;15(4):126-8.

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

Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(5):1203-09.

Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology:specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Pat Oral.* 2005;10:115-22.

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

Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of Five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000 88(2):125-34.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 90: Human Papillomaviruses. Lyon: IARC; 2007.

Jacobs A. Non-haematological effects of iron deficiency. *Clin Haematol.* 1982;11(2):353-64.

Jacobs MV, De Roda Husman AM, Van Den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-Specific Differentiation between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two Cocktails of Oligonucleotide Probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):901-5.

Jansisyanont P, Pazoki A, Ord RA. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplatation in a patient with Fanconi's anemia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(12):1454-7.

Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn.* 2004;8(2):107-13.

Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract.* 2002;11(1):32-5.

Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and Thinprep. *J Tenn Dent Assoc.* 2001;81(1):17-20.

Kaplan MJ, Sabio H, Wanebo HJ, Cantrell RW. Squamous cell carcinoma in the immunosuppressed patient: Fanconi's anemia. *Laryngoscope*. 1985;95(7):771-5.

Kaugars GE, Silverman S, Ray AD, Page EG, Abbey LM, Burns JC, et al. The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancers: is there a role for it in education and private practice? *J Cancer Educ*. 1998;13(2):85-9.

Kennedy AW, Hart WR. Multiple squamous cell carcinoma in Fanconi's anemia. *Cancer*. 1982;50(4):811-14.

Khleif SN, Degregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4350-4354, 1996.

Kleter B, Van Doorn LJ, Schegget JT, Shcrauwen L, Krimpen KV, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1731-39.

Kleter B, Van Doorn LJ, Shcrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, Schegget JT, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2508-17.

Kolb HJ, Socié G, Duell T, Van Lint MT, Tichelli A, Apperley JF, et al. Malignant Neoplasms in Long-Term Survivors of Bone Marrow Transplantation. *An Intern Med*. 1999;131(10):738-44.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-75.

Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol*. 2006;42(8):810-818.

Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(1):106-13 (a).

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-56 (b).

Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, Ben-Porat L, Satagopan J, Ngai I, et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinoma from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(22):1718-21 (c).

Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med*. 1992;21(6):265-9.

Linder J. Recent advances in ThinPrep Pap Test: a review of clinical studies. *Acta Cytol*. 1997;41(1):30-8.

Lowy DR, Gillison ML. A new link between Fanconi Anemia and Human Papillomavirus – associated malignancies. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(22):1648-50.

Lu SY, Wu HC. Initial diagnosis of anemia from sore mouth and improved classification of anemias by MCV and RDW in 30 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(6):679-85.

Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, Pereira NF, Ribeiro RC, Jeng M, et al. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the *FANCA* 3788-3790del mutation. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):669-73.

Marsh JCW. Results of immunosuppression in aplastic anemia. *Acta Haematol*. 2000;103(1):26-32.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, et al. X-linked inheritance of Fanconi Anemia complementation group B. *Nat Genet*. 2004;36(11):1219–24.

Merlin JC. Citologia Cérvico-vaginal: estudo dos métodos colpocitológicos convencional e monocamada ou base líquida. Baseado na celularidade retida em instrumentos de coleta. [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2002.

Millen FJ, Rainey MG, Hows JM, Burton PA, Irvine GH, Swirsky D. Oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Brit J Haematol*. 1997;99(2):410-14.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2001 91(6):622-35.

Mollaoglu N, Cowpe JG, Walker R. Cytomorphologic analysis of Papanicolaou stained smears collected from floor of the mouth mucosa in patients with or without oral malignancy. *Turk J Med Sci*. 2001;31:225-8.

Mondovits B, Vermylen C, Brichard B, Cornu G. Fanconi's anemia and molecular biology research. *Arch Pediatr*. 2001;8(8):853-60.

Montané E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarin E, Puig R, García N, et al. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica*. 2008;93(4):518-523.

Monto RW, Rizek RA, Fine G. Observations on the exfoliative cytology and histology of the oral mucous membranes in iron deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961;14:965-74.

Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1125-31.

Muñoz N, Bosch X, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.

Nasuti JF, Tam D, Gupta PK. Diagnostic value of liquid-based (ThinPrep) preparations in nongynecologic cases. *Diagn Cytopathol*. 2001;24(2):137-41.

Navarrete Cadena C, Guevara Yañes R, Salamanca Gómez F. Anemia de Fanconi: a propósito de un paciente. *Rev Mex Patol Clin*. 1993;40(1):14-8.

Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, et al. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology*. 2007;18(6):356-60.

Navone R, Marsico A, Reale I, Pich A, Broccoletti R, Pentenero M, et al. Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Minerva Stomatol.* 2004;53(3):77-86.

Neto JZ. Transplante de medula óssea em anemia de Fanconi escalonando doses decrescentes de ciclofosfamida. [tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 1999.

Nieburgs HE, Herman BE, Reisman H. Buccal cell changes in patients with malignant tumors. *Lab Invest.* 1962 11:80-88.

Nonogaki S, Wakamatsu A, Longatto Filho A, Pereira SM, Utagawa ML, Ferreira Alves VA, et al. Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infections in samples collected in a new collection médium: a comparison. *Acta Cytol.* 2004;48(4):514-20.

Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's Anemia. A case report. *J Periodontol.* 2001;72(11):1601-06.

Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(5):201-5.

Ogden GR, Wight AJ, Rice, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(5):216-20.

Ogilvie P, Hoffman UB, Brocker EB, Hamm H. Skin manifestations of Fanconi anemia. *Hautarzt.* 2002;53(4):253-7.

Oksuzoglu B, Yalçun S. Squamous cell carcinoma of the tongue in a patient with Fanconi Anemia: a case report and review of the literature. *Ann Hematol.* 2002;81(5):294-8.

Oliveira HP. Hematologia Clínica. 3 ed. São Paulo: Livraria Atheneu; 1988.

Oliveira ICS, Hauff SD. Anemia de Fanconi: a importância do diagnóstico precoce. *Arq Cat Med.* 1996;25(3):242-6.

Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otolaringol.* 2003;69(4):553-9.

Organización Panamericana de La Salud. Anemias nutricionais: informe de un grupo de expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 1972.

Ostwald C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *J Oral Pathol Med.* 1994;23(5):220-5.

Otan F, Açikgöz G, Sakallioğlu U, Ozkan B. Recurrent aphthous ulcers in Fanconi's anaemia: a case report. *Int J Paediatr Dent.* 2004;14(3):214-7.

Pasquini R, Neto JZ, Medeiros CR, Bitencourt MA, Bonfim CMS, Moreira VA, et al. Carcinoma de células escamosas em língua pós-transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25(4):239-46.

Pasquini R, Neto JZ. Anemia de Fanconi. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e prática.* São Paulo: Ed. Atheneu; 2001.

Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated Human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002 40(3):886-91.

Pektas ZO, Keskin A, Günhan O, Karslıoğlu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(4):628-35.

Perez OGR, Lopes MA, Navarro MCA. Citología exfoliativa em el diagnóstico precoz de lesiones oncológicas bucales. *Rev Cuba Estomatol.* 2002;39(2).

Pita MT, Loggetto SR, Seber A, Maluf EMCP, Lotério HA, Marques HJH et al. Tratamento da Anemia Aplástica. Projeto Diretrizes Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2001.

Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007;86(2):104-14.

Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998;27(2):83-6.

Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. Diagnosis of oral premalignant and malignant lesions using cytomorphometry. *Odontostomatol Trop*. 1999;22(85):23-8 (a).

Ramaesh T, Mendis BRRN, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco in buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med*. 1999;28(9):385-8 (b).

Ramalho VL, Ramalho HJ, Cipullo JP, Burdmann EA. Ciclosporine A-induced gingival hyperplasia. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(2):210-3.

Ranasinghe AJ, Warnakulasuriya KAAS, Tennekoon GE, Seneviratna B. Oral mucosal changes in iron deficiency anemia in a Sri Lankan female population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55:29-32.

Reinhard H, Peters I, Gottschling S, Ebell W, Graf N. Squamous cell carcinoma of the tongue in a 13-year-old girl with Fanconi Anemia. *Clin Lab Observations* 2007 29:488-491.

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

Rennie JS, MacDonald DG, Dagg JH. Iron and the oral epithelium: a review. *J R Soc Med*. 1984;77(7):602-7.

Riul S, Aguillar OM. Transplante de medula óssea. Organização da unidade e assistência de enfermagem. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária; 1996.

Rocha RS. Estudo citológico comparativo em mucosa jugal e borda lateral da língua em fumantes de cigarro artesanal e cigarro com filtro [dissertação]. Natal (RN): Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2000.

Romanini J. Utilização da citopatologia em campanha de prevenção do câncer bucal [dissertação]. Porto Alegre (RS): Patologia Bucal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.

Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2005;105(1):67-73.

Safaeian M, Herrero R, Hildesheim A, Quint W, Freer E, Van Dorn LJ et al. Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1447-54.

Sagaseta de Ilurdoz M, Molina J, Lezáun I, Valiente A, Durán G. Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales. *An Sist Sanit Navar*. 2003;26(1):63-78.

Santos CC, Gavish H, Buchwald M. Fanconi anemia revisited: old ideas and new advances. *Stem Cells*. 1994;12:142-53.

Schofield IDF, Worth AT. Malignant mucosal change in Fanconi's anemia. *J Oral Surg*. 1980;38(8):619-22.

Sepúlveda E, Brethauer U, Rojas J, Le Fort P. Oral manifestations of aplastic anemia in children. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(4):474-8.

Silva AAG. Manifestações estomatológicas em pacientes receptores de transplante renal sob terapia imunossupressora [tese]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Odontologia, PUCRS; 1997(a).

Silva MCA. Citopatologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino [dissertação]. Porto Alegre (RS): Patologia Bucal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997(b).

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

Sistema DNA-Citoliq. A Citologia em Nova Era: Manual Técnico de Treinamento. São Paulo; 2002.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(6):449-55(a).

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004 108(5):766-72(b).

Socié G, Henry-Amar M, Bacigalupo A, Hovs J, Tichelli A, Ljungman P, et al. Malignant Tumors Occurring after Treatment of Aplastic Anemia. *New Engl J Med*. 1993;329(16):1152-57.

Socié G, Scieux C, Gluckman E, Soussi T, Clavel C, Saulnier P, et al. Squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia – further evidence of a multistep process. *Transplantation*, 1998;66(5):667-70.

Spardy N, Duensing A, Charles D, Haines N, Nakahara T, Lambert PF, et al. The Human Papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. *J Virol*. 2007;81(23):13265-70.

Staats AJ, Robinson LH, Butterworth CE Jr. The effect of systemic therapy on nuclear size of oral epithelial cells in folate related anemias. *Acta cytol*. 1969;13(2):84-8.

Stanley M, Villa LL. Monitoring HPV vaccination. *Vaccine* 2008;26(1):24-7.

Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by viral E2 protein. *J Virol*. 1997;71(1):50-8.

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

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, 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.

Summersgill KS, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2001;91(1):62-9.

Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983;12(6):418-24.

Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. New York: John Wiley, 2000.

Syrjänen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):259-74.

Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Happonen RP. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol*. 1988;17(6):273-8.

Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: Recent progress. *Blood* 2006;107(11):4223-33.

Tekcicek M, Tavi B, Cakar A, Pinar A, Unal S, Gumruk F. Oral and Dental Findings in Children With Fanconi Anemia. *Ped Dent*. 2007;29(3):248-52.

Teraï M, Takagi M, Matsukura T, Sata T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28(3):137-40.

Trottier H, Franco EL. The epidemiology of human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24(S1):1-15.

Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 2003;148(8):1445-53.

Van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):779-87.

Van Duin M, Snijders PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbehuis AE, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer*. 2002;98(4):590-5.

Van Zeeburg HJ, Snijders PJ, Pals G, Hermesen MA, Rooimans MA, et al. Generation and molecular characterization of head and neck squamous cell lines of Fanconi Anemia patients. *Cancer Res.* 2005;65(4):1271-6.

Van Zeeburg HJ, Snijders PJF, Joenje H, Brakenhoff RH. Re: Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(12):968.

Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):651-5.

Villa LL. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res.* 71:321-41, 1997.

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.

White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Gene Dev.* 1994;8(6):666-7.

Woo PC, Lo SK, Yuen KY, Peiris JS, Siau H, Chiu EK, et al. Detection of CMV DNA in bone marrow transplant recipients: plasma versus leucocyte polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1997;50(3):231-5.

Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomavirus by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(5):524-31.

Young NS, Calado R, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 2006;108(8):2509-19.

Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med.* 2002;136(7):534-46.

Yurdakok K, Guner SU, Yalçın SS. Validity of using pallor to detect children with anemia. *Pediatr Int.* 2008;50(2):232-4.

Zhang L, Epstein JB, Poh CF, Berean K, Lam WL, Zhang X, et al. Comparison of HPV infection, p53 mutation and allelic losses in post-transplant and non-posttransplant oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(3):134–41.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR
Curitiba, 09 de julho de 2007.

Prezado Coordenador

Vimos através deste informar o andamento do projeto intitulado “**Estudo citomorfométrico de células bucais observadas pela citologia em base líquida em pacientes portadores de Anemia de Fanconi submetidos ao transplante de medula óssea**”. O projeto foi aprovado em 30 de novembro de 2005 por este Comitê e recebeu protocolo CEP – 1131.170/2005-11. O projeto está em nome do Dr. Ricardo Pasquini.

A pesquisa está em fase final de coleta das amostras, até o momento 70 pacientes foram avaliados, sendo previsto o total de 80 pacientes.

As análises citológicas já estão em andamento conforme as amostras são coletadas.

Comunicamos que houve uma modificação no processamento laboratorial do material coletado. Acrescentou-se à metodologia a pesquisa do HPV (*human papillomavirus*) através de reações de PCR (*polymerase chain reaction*) sendo este vírus um importante agente envolvido na carcinogênese. Salientamos ainda que o exame do paciente não foi em nada modificado, apenas acrescentou-se uma etapa no processamento laboratorial.

Aproveito a oportunidade para reiterar meus votos de estima e consideração.

Melissa Rodrigues de Araujo
Doutoranda em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Bauru
Universidade de São Paulo – USP.

APÊNDICE B

TÍTULO: ESTUDO CITOMORFOMÉTRICO DE CÉLULAS BUCAIS OBSERVADAS PELA CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.

INVESTIGADOR: Melissa Rodrigues de Araujo

INTRODUÇÃO

As informações que seguem neste consentimento servem a você e seus familiares para que seja entendido o propósito e a importância deste estudo para você mesmo e outras crianças portadoras de Anemia de Fanconi.

Sua participação é espontânea, ou seja, por vontade própria e de seus responsáveis.

Toda e qualquer dúvida ou pergunta deve ser feita para que possamos fazer os esclarecimentos necessários sobre a pesquisa e sobre sua participação nela. Os responsáveis por este estudo estarão sempre prontos a esclarecer dúvidas sobre a doença, portanto, é importante que você leia as informações a seguir com muita atenção para que tudo seja entendido.

FINALIDADE DO ESTUDO

O propósito deste estudo consiste em estudar as alterações que podem ocorrer na boca em pacientes com Anemia de Fanconi. Assim, medidas para melhoria da saúde bucal e tratamentos poderão ser realizados precocemente.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS

Esta pesquisa busca identificar as lesões que podem ocorrer em sua boca. Portanto serão examinados pacientes transplantados de medula óssea para Anemia de Fanconi e outras patologias, estão em acompanhamento após o transplante de medula óssea no Hospital de Clínicas e crianças não transplantadas.

No primeiro contato com a equipe responsável por este estudo, você será questionado sobre seus dados pessoais como idade, sexo e naturalidade. Ainda, sobre seu estado de saúde e de seus familiares para investigarmos sua história médica. Dados sobre sua doença como a fase na qual encontra-se, o tratamento ao qual você está sendo submetido e o uso de medicamentos, também será necessário ser obtido. A seguir será realizado um exame clínico intra-oral para verificarmos as lesões ou manifestações que podem estar ocorrendo. Dados como o local, a forma,

o tamanho e outros deverão ser anotados em uma ficha que se referirá apenas a você. Você será examinado com o uso de luvas descartáveis e seguindo as normas de biossegurança vigentes e determinadas pela Vigilância Sanitária.

Será realizado um exame de citologia, que consiste em passar uma escovinha de plástico em sua boca.

DESCRIÇÃO DE RISCOS

Este estudo não oferecerá risco algum a você nem a seus familiares, pois, os procedimentos indicados não são invasivos e o material utilizado é esterilizado.

BENEFÍCIOS POSSÍVEIS AOS PARTICIPANTES

Sua participação neste estudo fornecerá informações importantes para o conhecimento das lesões da Anemia de Fanconi e complicações do transplante de medula óssea. E com isto poderão ser aplicados ou melhorados os tratamentos para as lesões bucais pertinentes.

CUSTOS

Você ou seus familiares estão isentos de qualquer custo dos exames, fotografias ou de outros procedimentos que possam ser realizados durante a pesquisa. E de modo algum serão prejudicados financeiramente.

PARTICIPAÇÃO

Qualquer dúvida ou esclarecimento você poderá tirar mesmo durante a pesquisa com a Dra. Melissa Rodrigues de Araujo, cirurgiã-dentista, CRO PR 15.095. Sua participação é voluntária e você poderá se recusar a participar em qualquer momento se assim quiser. Nenhum prejuízo ocorrerá a você ou a seus familiares.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu _____, (pai / mãe / tutor)
de _____, li atentamente e entendi todas as
informações contidas neste esclarecimento sobre a participação de meu filho (a)
neste estudo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas assim como, a
importância da participação do meu filho neste estudo. Recebi uma cópia assinada
deste formulário de consentimento informado.

Concordo com a participação de meu filho neste estudo sem que nenhum prejuízo
seja causado a ele ou aos familiares. Tenho total conhecimento também que
nenhum ônus nos será cobrado.

Neste consentimento dou pleno direito para uso a favor do ensino e da divulgação
em periódicos científicos sem a divulgação da identidade do meu filho (a),
respeitando o código de ética.

Assinatura do Pai ou Mãe / Tutor legal

Data da assinatura

Nome em letra de forma do Pai ou Mãe/Tutor legal

Parentesco

Nome em letra de forma do Paciente

Assinatura do Paciente do estudo (se apropriado)

Data da assinatura

Assinatura da Pessoa que Administra este Consentimento

Data da assinatura

Nome em letra de forma da Pessoa que Administra este Consentimento

APÊNDICE C**FICHA CLÍNICA:**

Data: __/__/__

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE :

Nome.....

Idade : anos (...../...../.....) Sexo ☐ M ☐ F Cor: ☐ Melanoderma☐ Feoderma ☐ Leucoderma ☐ XantodermaEstado civil : ☐ Solteiro ☐ Casado ☐ Outro

Profissão:.....Escolaridade.....

Naturalidade:Procedência:.....

Endereço :

..... Fone :

Nome do acompanhante:.....

HISTÓRIA MÉDICA:

Medicamentos em uso:.....

Tempo do TMO (Data):.....

Estado de saúde geral: ☐ Bom ☐ Razoável ☐ RuimHistória familiar: ☐ Diabetes ☐ Cardiopatias ☐ Doença reumática☐ Neoplasias ☐ Doença hemorrágica ☐ Alergias ☐ Doença nervosa ☐ Doença renal ☐ Outras

.....

.....

Queixas (fraqueza, cansaço, dispneia acentuada, palidez, taquicardia, hipotensão postural. Sintomas sugestivos de neuropatias como parestesias das extremidades, distúrbios do paladar e do olfato, depressão, irritabilidade, esquecimento):

.....

Lesões em pele ou outros órgãos:.....

.....

Já apresentou neoplasias? Onde?.....

.....

EXAME HEMATOLÓGICO: Data __/__/__

Hemoglobina:.....

EXAME INTRA-ORAL: Manifestações Estomatológicas:

Localização:

Tamanho:

Cor:

Forma:

Inserção:

Consistência:

Mobilidade:

Sinais secundários:

Fator etiológico:

Gânglios linfáticos

Outras lesões:

Diagnóstico Clínico: _____

DESENHOS ESQUEMÁTICOS:

APÊNDICE D**FICHA DE ANÁLISE CITOLÓGICA:**

Número do registro: _____

TIPO DE ALTERAÇÃO	AUSENTE	PRESENTE
ALTERAÇÕES CELULARES		
Pleomorfismo nuclear e formas bizarras		
Anisocitose		
Anisocariose		
Aumento de volume celular		
Alterações displásicas		
Pleomorfismo celular		
ALTERAÇÕES NUCLEARES		
Aumento de tamanho nuclear		
Redução proporção núcleo: citoplasma		
Hipercromasia nuclear		
Grumos/cordões grosseiros de cromatina		
Nucléolos aumentados de tamanho		
Nucléolos múltiplos		
Espessamento acentuado e irregular da membrana nuclear		
Multinucleação celular		
Mitoses atípicas		

CLASSIFICAÇÃO DO ESFREGAÇO:

CLASSE 0	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV	CLASSE V
-----------------	-----------------	------------------	-------------------	------------------	-----------------

APÊNDICE E

Dados obtidos ao exame clínico e principais efeitos adversos que podem estar associados às medicações utilizadas pelos pacientes.

Grupo	Amostra	Manifestação oral	Medicamentos em uso	Efeitos adversos medicamentosos comuns relacionados à boca
I	23	Candidose pseudomembranosa e eritematosa do palato	NENHUM	
I	29	Leucoplasia em língua	NENHUM	
I	30	Gengivite	NENHUM	
I	32	NDN	NENHUM	
I	33	NDN	NENHUM	
I	39	NDN	NENHUM	
I	40	NDN	NENHUM	
I	43	Microstomia	Norditropin, Puran T4, Prednisona	Norditropin (hormônio de crescimento): não são relatados efeitos adversos na boca Puran T4 (levotiroxina sódica): não são relatados efeitos adversos na boca Prednisona: não são relatados efeitos adversos na boca.
I	50	NDN	NENHUM	
I	51	NDN	NENHUM	
I	52	NDN	NENHUM	
I	56	Hiperqueratose mucosa jugal	NENHUM	
I	58	Hiperqueratose palato duro	Ritalina, Hormotrop, Puran T4 Tacrolimo, Bactrim, Prednisona, Amitriptilina	Ritalina (metilfenidato): ressecamento dos lábios e boca Hormotrop (somatropina - hormônio de crescimento)
I	69	Gengivite	Ciclosporina, Bactrim, Fenitoína, Micofenolato mofetil	Tacrolimo: não são relatados efeitos adversos na boca Amitriptilina (triptanol): secura boca
I	70	NDN	NENHUM	
I	73	Gengivite	NENHUM	
I	74	Glossite migratória benigna	Ciclosporina, Bactrim	Bactrim (sulfametoxazol + trimetoprima): lesões na boca Fenitoína: hiperplasia gengival, alteração do sabor, aumento dos lábios Micofenolato mofetil: hiperplasia, gengival, gengivite, ulceração da boca
I	77	Gengivite	NENHUM	
I	78	NDN	NENHUM	
I	82	UAR palato duro	Prednisona	Ciclosporina: hiperplasia gengival
II	2	NDN	Bactrim	
II	3	Gengivite	Hemogenin, Prednisona	Hemogenin (oximetolona): não são relatados efeitos adversos na boca
II	4	Gengivite	NENHUM	

II	5	NDN	Complexo B, Ácido fólico	Vitamina do Complexo B: não são relatados efeitos adversos na boca Ácido fólico: não são relatados efeitos adversos na boca
II	6	NDN	NENHUM	
II	8	NDN	NENHUM	
II	9	Gengivite	Hemogenin	
II	10	NDN	Hemogenin	
II	14	NDN	NENHUM Ciclosporina, Prednisona, Bactrim,	
II	15	Hiperplasia gengival	Fluconazol.	Fluconazol: boca seca
II	18	NDN Lesão traumática em mucosa alveolar superior	Bactrim, Fluconazol	
II	19		NENHUM	
II	20	NDN	NENHUM	
II	21	NDN	NENHUM	
II	31	NDN	Prednisona	
II	35	NDN	NENHUM	
II	36	Pigmentação melânica lingual	NENHUM Ácido fólico,	
II	37	Verruga vulgar, UAR. Lesão traumática em língua	Complexo B, Bactrim Prednisona,	
II	38		Carbamazepina	Carbamazepina: boca seca
II	44	NDN	NENHUM	
II	59	NDN	Ácido fólico.	
II	83	Lesão traumática em mucosa jugal	Hemogenin Captopril, Propranolol,	Captopril: angioedema na face, lábios, membranas mucosas, língua, glote ou laringe e boca seca
III	1	NDN	Anlodipina	Anlodipina: alteração no paladar e hiperplasia gengival
III	7	NDN	NENHUM	Propranolol: não são relatados efeitos adversos na boca. Gynera (anticoncepcional): não são relatados efeitos adversos na boca
III	11	UAR em língua	Gynera	
III	12	Lesão traumática por prótese Candidose eritematosa palato duro	NENHUM	
III	13		NENHUM	
III	16	Gengivite	NENHUM	
III	17	NDN	Captopril, Ácido fólico	
III	42	NDN	NENHUM	
III	45	Hiperplasia gengival medicamentosa	Ciclosporina	
III	46	NDN	Atenolol Captopril,	Atenolol: boca seca
III	47	NDN	hidroclorotiazida	
III	53	NDN	NENHUM	
III	71	NDN	NENHUM	
III	72	NDN	Ciclosporina	
III	75	Pigmentação melânica gengival	NENHUM	

		Pigmentação	
III	76	melânica gengival	NENHUM
III	79	NDN	NENHUM
III	80	Língua saburrosa	NENHUM
IV	22	NDN	NENHUM
IV	24	NDN	NENHUM
IV	25	UAR mucosa jugal	NENHUM
IV	26	NDN	NENHUM
IV	27	NDN	NENHUM
IV	28	NDN	NENHUM
IV	34	NDN	NENHUM
IV	41	NDN	NENHUM
IV	48	NDN	NENHUM
IV	49	NDN	NENHUM
IV	54	NDN	NENHUM
IV	55	NDN	NENHUM
IV	57	NDN	NENHUM
IV	60	NDN	NENHUM
IV	61	NDN	NENHUM
IV	63	NDN	NENHUM

APÊNDICE F

Dados obtidos na avaliação do hemograma quanto ao quadro anêmico dos pacientes dos grupos I, II e III.

Grupo	Amostra	Anemia
I	23	N
I	29	N
I	30	Não disponível
I	32	N
I	33	N
I	39	N
I	40	N
I	43	N
I	50	N
I	51	N
I	52	N
I	56	N
I	58	N
I	69	N
I	70	N
I	73	N
I	74	N
I	77	N
I	78	N
I	82	N
II	2	S
II	3	S
II	4	S
II	5	S
II	6	S
II	8	S
II	9	Não disponível
II	10	S
II	14	N
II	15	S
II	18	S
II	19	N
II	20	S
II	21	S
II	31	N
II	35	S
II	36	S
II	37	S
II	38	N
II	44	S
II	59	S
II	83	S
III	1	N

III	7	N
III	11	N
III	12	N
III	13	N
III	16	N
III	17	S
III	42	N
III	45	N
III	46	N
III	47	N
III	53	N
III	71	N
III	72	N
III	75	N
III	76	N
III	79	N
III	80	N

Legenda: N (não) – paciente não anêmico

S (sim) – Paciente anêmico

APÊNDICE G

Quantificação do gene beta globina por PCR em tempo real usando o sistema SYBR Green.

Amostra	Ct Média	DNA Média ng/μl
1	24,64	0,651
2	28,96	0,023
3	25,14	0,440
4	22,43	3,620
5	21,47	7,700
6	26,61	0,141
7	21,38	8,220
8	27,87	0,055
9	22,79	2,750
10	23,68	1,380
11	23,99	1,080
12	21,04	11,200
13	22,46	3,570
14	24,5	0,807
15	25,28	0,436
16	25,6	0,310
17	26,42	0,167
18	25,36	0,384
19	24,73	0,660
20	22,47	4,000
21	27,47	0,040
22	31,6	0,003
23	23,38	1,030
24	25,44	0,198
25	29,17	0,010
26	25,96	0,128
27	25,65	0,178
28	31,94	0,003
29	27,33	0,043
30	25,04	0,442
31	25,41	0,207
32	24,26	0,505
33	21,71	3,890
34	31,07	0,005
35	28,47	0,017
36	27,99	0,026
37	26,18	0,109
38	32,01	0,001
39	24,40	0,482
40	30,42	0,004
41	29,76	0,006
42	31,10	0,002
43	23,54	0,896

44	22.51	2,110
45	20.88	5,310
46	21.36	3,510
47	26.43	0,037
48	24.26	0,254
49	27.70	0,012
50	20.93	5,210
51	24.61	0,185
52	20.87	5,330
53	22,65	2,780
54	28.68	0,005
55	29.24	0,003
56	26.66	0,030
57	25.77	0,066
58	24.77	0,164
59	23.66	0,435
60	27.87	0,010
61	26.75	0,027
63	23.28	0,719
69	24,11	0,854
70	28,16	0,027
71	25,63	0,222
72	27,32	0,058
73	19,97	24,300
74	25,97	0,167
75	27,42	0,052
76	27,95	0,032
77	24,9	0,417
78	25,94	0,172
79	24,73	0,467
80	21,29	8,090
82	24,62	0,512
83	25,55	0,236

Legenda: ng/µl – nanogramas por microlítro

Ct – cycle threshold (ciclo limiar)

APÊNDICE H

Quantificação do DNA utilizando a sonda para o gene beta globina e a carga viral utilizando a sonda HPV-E6 por PCR em tempo real.

Amostras	Beta globina	Carga viral sonda E6	Cópias do HPV em 50ng de beta globina
39	$3,72 \times 10^{-1}$ ng/ μ l	$1,70 \times 10^1$ cópias/ μ l	$2,28 \times 10^3$
66	$2,24 \times 10^{-1}$ ng/ μ l	$4,53 \times 10^1$ cópias/ μ l	$1,01 \times 10^4$

Fonte: Cálculo da carga viral: PEITSARO, JOHANSSON, SYRJÄNEN (2002).

Ilustração da PCR em tempo real utilizando a sonda E6. A: Gráfico de amplificação. B: Curva padrão formada pelas diluições do genoma completo HPV-16 e amostras. * Pontos da curva padrão formada pelo genoma completo do HPV-16. # Amostras positivas para E6. ∞ Amostras negativas para a sonda E6.

ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 30 de novembro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ricardo Pasquini
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO CITOMORFOMÉTRICO DE CÉLULAS BUCAIS OBSERVADAS PELA CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 29 de novembro de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP: 1131.170/2005-11
CAAE: 0512.0.208.000-05

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 30 de maio de 2006.

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO B

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra tabela de interpretação

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra
Interpretation Chart

Probe #		HPV genotypes																																				
		6	11	16	18	18	26*	31	33	35	39	40	43	44	45	45	51	52	53*	53*	54	56	58	58	58	58	58	58	59	66*	68	69	70	70	71	73	82	
1	LR	X																																				
2	HR		X																																			
3	LR			X																																		
4	HR				X																																	
5	LR						X																															
6	HR																																					
7	LR																																					
8	HR											X																										
9	LR											X																										
10	HR											X																										
11	LR																																					
12	HR																																					
13	LR																																					
14	HR																																					
15	LR																																					
16	HR																																					
17	LR																																					
18	HR																																					
19	LR																																					
20	HR																																					
21	LR																																					
22	HR																																					
23	LR																																					
24	HR																																					
25	LR																																					
26	HR																																					
27	LR																																					
28	HR																																					

* : 26, 53 and 66 are considered probable high-risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.

ANEXO C

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra cartão de leitura.

ANEXO D

Folha de leitura INNO-LiPA HPV Genotyping Extra

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*

Data reporting sheet

LiPA Strip	Sample ID	Reactive lines	Genotyping Result	Remarks
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

© 2007 Innogenetics

Amplification date(s):

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* date(s):

Lot no.

Lot no.

Performed by:

Approved by:

INNOGENETICS®
 BIOTECHNOLOGY FOR HEALTHCARE

 27278 v0
 2007-08-29

ANEXO E

Folha de leitura Consensus High Risk HPV Genotyping Kit (Digene).

Consensus High Risk HPV Genotyping kit
DATA REPORTING SHEET

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Conj. control																																
HPV 16																																
HPV 18																																
HPV 26																																
HPV 31																																
HPV 33																																
HPV 35																																
HPV 39																																
HPV 45																																
HPV 51																																
HPV 52																																
HPV 53																																
HPV 56																																
HPV 58																																
HPV 59																																
HPV 66																																
HPV 68																																
HPV 73																																
HPV 82																																

Strip	Sample id.	Genotyping Result	CONC $\mu\text{g}/\text{mL}$
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			

Test date:

Lot No:

Performed by:

DIGENE

K10067 v1.0