Julio Cesar Betiol

Prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço de São Paulo, Brasil

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.**

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo

São Paulo

2014

Julio Cesar Betiol

Prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço de São Paulo, Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Versão Corrigida. A versão original se encontra disponível tanto na biblioteca da unidade que aloja o programa quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo

São Paulo

2014

DEDICATÓRIA

À Deus, pela presença constante e essencial em todas as etapas da vida.

À minha família, por representarem a base de meu caráter, fonte de inspiração nos momentos nebulosos e ponto de equilíbrio, tanto na empolgação excessiva das conquistas, quanto no desalento das falhas.

À meus amigos, obrigado por me suportarem e me aceitarem, nos momentos de comemoração e também nas fases de dedicação.

À minha namorada, amiga, amante e mulher. Sem você não teria sentido continuar e recomeçar a todo o momento.

À minha querida orientadora e amiga Dra. Laura Sichero, por me ensinar muito mais do que ciência, por ter representado o exemplo de caráter, dedicação e honestidade a serem seguidos. Obrigado por ter regido com maestria e me ensinado a encarar os momentos de alegria e os momentos de descontento.

À meu segundo pai, João Sobrinho, por me ouvir, aconselhar e cobrar, e como todo pai, saber aceitar o meus defeitos e entender minha limitações, encarando-as com amor. Obrigado big dye.

À Dra. Luisa Villa, pela sua liderança nata e tato ao lidar com a personalidade de cada um. Obrigado por nos ensinar a fazer ciência com amor e por nos dedicar carinho de mãe. Sou privilegiado por ter passado este tempo ao seu lado.

À Maria Antonieta Andreoli (Totó), obrigado por toda a paciência, carinho e dedicação que me ofertou ao longo destes anos. Você foi essencial Totó, obrigado!!

À Silvaneide Ferreira, pela amizade e pelo comprometimento ao auxiliar-nos em momentos que não somos mais capazes de realizar os compromissos pelos quais me responsabilizei.

À Maria Cecília Costa, pelo companheirismo e amizade que me dedicou todo este tempo.

À Dra. Lara Termini e à Rafaella Almeida Lima, pelo auxílio e dedicação em etapas essenciais deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi realizado em colaboração com:

1- Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão, Dr. Evandro Sobroza de Mello, Dr. Marco Aurelio Kulcsar, Dr. Leandro Luongo de Matos, Dra. Sheila Friedrich Faraj, Dr. Fabio Roberto Pinto, Dr. Ibere Cauduro Soares, Prof.Dr. Roger Chammas, Lara Zimmermann e Maria Stella Hering.

2- Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves, Dr. Marcelo Benedito Menezes, Dr. Henrique Olavo de Olival Costa, Dr. Leonardo Silva, Dra. Lia Mara Rossi e Natália Cruz.

3- Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP: João Simão Sobrinho e Silvanaide Ferreira.

4- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus: Dra. Lara Termini, Maria Antonieta Andreoli, Maria Cecília Costa, Rafaella Almeida Lima e Raquel Hessel.

À FAPESP pelo auxílio financeiro deste projeto de pesquisa (Processo nº11/09616-9) e pelo auxílio com a bolsa de mestrado (Processo nº12/01513-9). Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo auxílio financeiro.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de figuras	10
Lista de tabelas	12
Lista de gráficos	13
Lista de quadros	14
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	15
Resumo	18
Abstract	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. HPV	20
1.2. Infecção viral	23
1.3. Proteínas virais precoces	27
1.3.1. Proteínas E1 e E2	27
1.3.2. Proteína E4	28
1.3.3. Proteína E5	28
1.3.4. Proteína E6	29
1.3.5. Proteína E7	31
1.4. Proteínas estruturais virais	33
1.4.1. Proteína L1	33
1.4.2. Proteína L2	34
1.5. Taxonomia viral	34
1.6. HPV e tumores de cabeça e pescoço	41
1.6.1. Tumores de cabeça e pescoço no Brasil	48
1.6.2. Tumores de cabeça e pescoço em São Paulo	51

1.7. Proteína P16 ^{INK4a}	52
1.8. Vacina profilática	56
1.9. Justificativa	57
2. OBJETIVO	58
2.1. Objetivos específicos	58
3. METODOLOGIA	59
3.1. Amostras clínicas	59
3.2. Extração de DNA	61
3.3. Diagnóstico viral e genotipagem	62
3.4. Análise de linhagens moleculares de HPV-16	64
3.4.1. PCR tipo específica	66
3.4.2. Clonagem e sequenciamento	67
3.5. Análise dos níveis da proteína P16 ^{INK4a}	68
3.6. Seleção de amostras	69
4. RESULTADOS	70
4.1. Série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo	70
4.1.1. Amostras analisadas por subsítio anatômico	71
4.1.2. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio- específica	71
4.1.3. Perfil de expressão de P16 ^{INK4a} celular	74
4.1.4. Linhagens moleculares de HPV-16 – Santa Casa	75
4.2. Série de tumores oriundos do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP	76

4.2.1. Amostras analisadas por subsítio anatômico	77
4.2.2. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica	78
4.2.3. Perfil de expressão de P16 ^{INK4a} celular	80
4.2.4. Linhagens moleculares de HPV-16 - ICESP	81
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Prevalência de HPV nas amostras de tumores de cabeça e pescoço	83
5.1.1. Prevalência de HPV em cavidade oral	86
5.1.2. Prevalência de HPV em laringe	87
5.1.3. Prevalência de HPV em orofaringe	89
5.2. Linhagens moleculares de HPV-16	90
5.3. Expressão da proteína P16^{INK4a} celular	93
6. CONCLUSÃO	96
7. ANEXO	98
8. REFERÊNCIAS	99

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do genoma completo de HPV-16.-

Figura 2 - Mecanismo de infecção pelo HPV.

Figura 3 - Correlação entre o programa de diferenciação celular e o ciclo de vida de HPV.

Figura 4 - Desregulação do ciclo celular desencadeada pelo HPV.

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura da proteína E7 do HPV-16 e seus alvos celulares.

Figura 6 - Estrutura do capsídeo do HPV (à esquerda) (Buck e Trus, 2012), e estrutura tridimensional do capsômero composto por 5 unidades da proteína L1 (à direita).

Figura 7 - Divergência evolucionária e geográfica das linhagens de HPV-16 ao longo da pré-história.

Figura 8 - Árvores filogenéticas das linhagens de HPV-16 e HPV-18.

Figura 9 - Árvore filogenética representando os tipos e as linhagens /sublinhagens da espécie alfa-9 de HPV.

Figura 10 - Classificação esquemática das características etiológicas e fenotípicas do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Figura 11 - Incidência de câncer de cabeça e pescoço na América Latina em 2008.

Figura 12 - Proposta de um modelo integrado de carcinogênese molecular para os tumores de células escamosas de cabeça e pescoço.

Figura 13 - Agrupamento de sítios anatômicos para categorização de tumores de cabeça e pescoço.

Figura 14 - Diagrama do teste de Inno-LiPA.

Figura 15 - Sistema adotado de escore para a avaliação por imunohistoquímica da expressão de p16INK4a em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (aumento de 100x).

Figura 16 - Alinhamento da sequência nucleotídica (região de 213pb da LCR) de três amostras HPV-16 positivas oriundas da série de tumores provenientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Figura 17 - Alinhamento de sequência nucleotídica de 99pb do gene *E6* de 4 amostras HPV-16 positivas.

Figura 18 - Árvore filogenética de linhagens de HPV-16 representando a distribuição de linhagens de HPV-16.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Prevalência e incidência de tumores de cabeça e pescoço no Brasil em 2012.

Tabela 2 - Iniciadores construídos para a análise de linhagens de HPV-16.

Tabela 3. Mutações características de cada linhagem, localizadas na região amplificada pelos iniciadores descrito na tabela 2

Tabela 4. Idade e sexo dos indivíduos que compuseram as séries de tumores analisadas.

Tabela 5 - Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica na série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Tabela 6 - Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica na série de tumores oriundos do ICESP.

Tabela 7 - Estudos de prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço conduzidos no mundo.

Tabela 8 - Estudos de prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço conduzidos no Brasil.

Tabela 9 - Expressão de P16^{INK4a} celular em tumores de orofaringe de acordo com o status de HPV.

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Consumo de cigarro *per capita* na União Européia e Brasil no período de 1970 a 2000.

Gráfico 2 - Incidência de tumores de orofaringe, tonsila, laringe e boca (em número de casos) diagnosticados no município de São Paulo, Brasil, no período de 1997 a 2008 e de acordo com o sexo dos indivíduos afetados

Gráfico 3 - Proporção de amostras analisadas por sítio anatômico (n=94), série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Gráfico 4 - Perfil de expressão de P16^{INK4a} dentre as amostras oriundas de tumores de cabeça e pescoço provenientes da série da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Gráfico 5 - Proporção de amostras analisadas por sítio anatômico (n= 79), série de tumores oriundos do ICESP.

Gráfico 6 - Perfil de expressão de P16^{INK4a} dentre as amostras oriundas de tumores de cabeça e pescoço provenientes da série ICESP.

Lista de Quadros

Quadro 1 - Classificação do HPV-16 em linhagens e sublinhagens.

Quadro 2 - Características de tumores de cabeça e pescoço associados ao HPV e não associados ao HPV.

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

μL - Microlitro

μM - Micromolar

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Estados Unidos da América

CDK4 - Ciclina dependente de quinase 4

CDK6 - Ciclina dependente de quinase 6

CIN - Instabilidade cromossomal

CKI - Inibidor de quinase dependente de ciclina (*Ciclin Kinase Inhibitor*)

CR1 - Região conservada 1, proteína E7

CR2 - Região conservada 2, proteína E7

DEIA - Imunoensaio Enzimático de Ácido Desoxiribonucleico

DNA - Ácido desoxiribonucleico

E - Região precoce de HPV (*early*)

E2F - Grupo de genes e proteínas da família dos fatores de transcrição E2F

FFPE - Fixado em formalina e incluído em parafina (*formalin-fixed paraffin embedded*)

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - Papilomavírus Humano

HSIL - lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (cérvice uterina) (*high grade squamous intraepithelial lesion*)

HSPG - Proteoglicanas de heparan sulfato

HSV-2 - *Herpes simplex* vírus-2

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer

ICESP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

ICO - Instituto Catalão de Oncologia, Barcelona, Espanha

Kdal - Kilo Dalton

L - Região tardia de HPV (*late*)

LCR - Região longa de controle (*Long Control Region*)

mL - Mililitro

n - Número de casos

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

°C - Grau Celsius

OR - Chance de Risco (*Odds Ratio*)

ORF – Fase de leitura aberta (*Open Reading Frames*)

p15^{INK4b} - Inibidor de quinase dependente de ciclina

P16^{INK4a} - Inibidor de quinase dependente de ciclina, CK12A

P21 - WAF1, inibidor de quinase dependente de ciclina, CK1

P27 - Inibidor de quinase dependente de ciclina, CK1B

P53 - Proteína supressora tumoral P53

pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pRb - Proteína do retinoblastoma

RNA - Ácido ribonucléico

RPM - Rotações por minuto

Santa Casa - Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polimorphism*)

Sp1 - Fator de transcrição da família Sp/KLF

TBP - Proteína ligante a *TATA*

TNM - T (tamanho do tumor primário), N (envolvimento regional de linfonodo), M (presença de metástase)

UICC - União Internacional Contra o Câncer (*International Union Against Cancer*)

VLP - Partícula semelhante à vírus (*Virus Like Particles*)

RESUMO

Betiol JC. *Prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço em São Paulo, Brasil [dissertação]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUÇÃO: O papilomavírus humano (HPV) encontra-se amplamente distribuído na população mundial. Apesar da grande maioria das infecções serem transientes, assintomáticas e passíveis de regressão espontânea, a infecção persistente por tipos de alto risco de HPV é necessária para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais. Uma vez que apenas uma pequena parcela das infecções progride à lesões malignas após um longo período desde o diagnóstico inicial de lesões precursoras, tem-se iniciado a busca por fatores que possam influenciar na progressão ou na eliminação destas manifestações iniciais. A variabilidade genética viral tem sido apontada como um dos fatores que interagem neste processo. Embora virtualmente todos os tumores da cérvix uterina apresentem o DNA viral, neoplasias em outros sítios anatômicos têm sido apenas em parte correlacionadas com a presença viral, sendo o HPV proposto como um dos agentes causadores de tumores em sítios de cabeça e pescoço. **MÉTODOS:** Espécimens clínicos de tumores de cabeça e pescoço, fixados em formalina e contidos em parafina (FFPE), provenientes do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (n=79) e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (n=94), tiveram seu DNA extraído, seguido de diagnóstico e genotipagem de HPV pela metodologia de Inno-LiPA. Análises de linhagens moleculares foram realizadas nas amostras HPV-16 positivas. Análise imunohistoquímica de P16^{INK4a} foi realizada em todas as amostras. **RESULTADOS:** A presença do DNA viral foi encontrada em 24,1% (19/79) dentre a série de tumores provenientes do ICESP, sendo a cavidade oral o sítio em que foi observada a maior proporção de DNA viral (27,1%), enquanto que 13,8% (13/94) dentre os espécimens provenientes da Santa Casa apresentaram-se positivos para HPV, sendo a cavidade oral o sítio em que foi observada a maior proporção do DNA viral (18,1%). O HPV-16 foi o tipo mais prevalente, detectado em 73,4% das amostras HPV positivas provenientes do ICESP e 61,5% das amostras provenientes da Santa Casa. Independente da Instituição, as amostras foram alocadas no clado das linhagens Asiático-Americana e Europeia em 50%, cada uma, entre os 18 tumores HPV-16 positivos em que as análises de linhagem foram possíveis. Não foi observada, nestas séries, correlação entre a superexpressão de P16^{INK4a} e a presença do DNA viral. **CONCLUSÃO:** Nas amostras analisadas, o DNA de HPV foi detectado em 18,5% dos 173 espécimens. O HPV-16 foi o tipo mais prevalente. Isolados da linhagem Europeia e da linhagem Asiático-Americana foram detectados em 50% dos casos, cada uma, dentre as amostras HPV-16 analisadas por este estudo.

Descritores: 1.Papillomavirus humano 2.Neoplasias de cabeça e pescoço 3.Papillomaviridae/classificação 4.Inibidor p16 de quinase ciclina-dependente 5.Reação em cadeia da polimerase 6.Análise de sequência de DNA

ABSTRACT

Betiol JC. *HPV prevalence in head and neck tumors from São Paulo, Brasil* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION: Human papillomaviruses (HPV) are widely distributed worldwide. Although the majority of infections are usually transient, asymptomatic and frequently regress spontaneously, persistent infections by high-risk HPVs are necessary for the development of cervical intraepithelial neoplasia. Once only a small proportion of infections progress to malignant lesions after a long period of time since the initial diagnosis of precursor lesions, the search for factors that might influence the progression or clearance of these early manifestations are currently under way. Viral genetic variability has been proposed as one of the factors interacting in this process. Although virtually all cervix tumors present the viral DNA, neoplasias from other anatomical sites have been only in part correlated with viral presence, and HPV has been proposed as one causative agent in tumors from head and neck sites.

METHODS: Clinical specimens of formalin-fixed paraffin embedded head and neck tumors, provided by the Cancer Institute of São Paulo (n=79) and also by the Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (n=94), were submitted to DNA extraction and further HPV diagnostic and genotyping by the Inno-LiPA methodology. Molecular lineages analyses were performed in all HPV-16 positive samples. P16^{INK4a} immunohistochemical analyses were conducted in all samples. **RESULTS:** HPV DNA was detected among 24.1% (19/79) of samples provided by ICESP, tumors from oral cavity presented the highest viral positivity (27.1%), whereas 13,8% (13/94) of the samples from Santa Casa presented HPV DNA, tumors from the oral cavity also presented the highest HPV positivity with 18.1% of viral DNA presence. HPV-16 was the most prevalent type detected in 73.4% and 61.5% of HPV positive ICESP and Santa Casa samples, respectively. Irrespective of the Institution, samples submitted to lineage analyzes were allocated in the Asiatic-American and European phylogenetic branches in 50%, each one, among the 18 tumors HPV-16 positive for which lineage analysis was possible. No correlation between P16^{INK4a} overexpression and HPV DNA presence was observed. **CONCLUSION:** In this study, HPV DNA was detected in 18.5% among 173 head and neck tumor specimens. HPV-16 was the most prevalent type. The European and the Asiatic-American lineage were detected in 50% of the cases, each one, among the cases HPV-16 positive analyzed.

Descriptors: 1.Human Papillomavirus 2.Head and Neck Neoplasms 3.Papillomaviridae/classification 4.Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16 5.Polymerase Chain Reaction 6.Sequence Analysis, DNA

1. INTRODUÇÃO

1.1. HPV (Papilomavírus Humano)

Os papilomavírus compreendem uma antiga família de vírus que infectam os tecidos epiteliais de anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Estes vírus têm co-evoluído com seus hospedeiros naturais, não infectando de maneira inter-espécie (revisado por de Villiers *et al.*, 2004). Os papilomavírus são compostos por um capsídeo icosaédrico, formado por 72 capsômeros pentaméricos de aproximadamente 52-55nm de diâmetro. São vírus não-envelopados que contém no interior da partícula uma molécula dupla fita de DNA circular de aproximadamente 8.000 pares de bases complexadas à histonas celulares. O genoma de todos os tipos de HPV contém ao redor de oito genes, sendo dividido em três partes funcionais: região precoce (*E-early*) codificadora das proteínas E1-E7 necessárias para a replicação e transcrição viral; região tardia (*L-late*) codificadora das proteínas estruturais L1-L2 necessárias para a formação do vírion; e uma região não codificante (*LCR-long control region*) que contém elementos necessários para a regulação da replicação e transcrição do DNA viral (revisado por IARC, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do genoma completo de HPV-16 (Smith B, *et al.*, 2011). Região tardia (L), e precoce (E), região regulatória da transcrição viral (URR) e região não codificante (NCR).

A existência de diferentes tipos de HPV foi sugerida inicialmente pela demonstração de que isolados virais de verrugas plantares possuíam diferentes padrões de clivagem por endonucleases de restrição (Gissmann e zur Hausen, 1976). Atualmente 182 tipos de HPV já foram caracterizados pelo sequenciamento completo de seus genomas (International Human Papillomavirus Reference Center, Karolinska Institutet, 2013), dos quais aproximadamente 40 tipos infectam o epitélio do trato anogenital e mucosas ao longo do corpo humano (revisado por de Villiers *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos classificam como oncogênicos em humanos 13 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66) (revisado por IARC, 2007). O risco associado ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de colo de útero (NIC-neoplasia intraepitelial cervical) é maior para os HPV de alto risco oncogênico quando comparado com os tipos de baixo risco.

As maiores taxas de risco ocorrem ao comparar o HPV-16 e HPV-33 com tipos de baixo risco, apresentando até 10 vezes maior chance de desenvolvimento de NIC2+ e até 25 vezes maior chance de desenvolvimento de NIC3+ (Jaisamrarn *et al.*, 2013).

Inicialmente os padrões de prevalência e associação do HPV com lesões genitais foram distorcidos pela variabilidade da sensibilidade e especificidade que as combinações de iniciadores, utilizados em metodologias de diagnóstico baseada em PCR (reação em cadeia da polimerase) forneciam para a amplificação de tipos específicos de HPV (revisado por de Villiers., 2013). Porém, ao analisar uma parcela de amostras consideradas HPV negativas de um estudo multicêntrico (International Biological Study on Cervical Cancer - IBSCC) com uma metodologia baseada em PCR que incluía 14 iniciadores tipo-específicos complementares ao gene *E7*, uma prevalência de 99,7% de tumores de colo de útero contendo o DNA de HPV foi observada. Assim, foi estabelecida a mais alta fração de um tumor humano já atribuído a um fator específico, sendo referido que virtualmente todos os tumores de colo de útero contêm o DNA de HPV (Walboomers *et al.*, 1999). Estudos de simulação computacional tem estimado que a probabilidade de transmissão do HPV seja em média de 40% por ato sexual, estimativa que supera as taxas de outros vírus como HIV (vírus da imunodeficiência humana) e HSV-2 (*Herpes simplex* vírus-2) (Burchell *et al.*, 2006). Estima-se que ao longo da vida de um adulto sexualmente ativo, a taxa de exposição ao HPV para os sítios orais ou anogenitais seja de 65 à 100% (Pytynia *et al.*, 2014).

Apesar da ampla diversidade, distribuição e transmissibilidade deste agente na população, mais de 90% das infecções genitais por tipos de HPV de

alto risco são eliminadas alguns anos após a aquisição (Rodríguez *et al.*, 2010). A fração de portadores de infecção persistente do HPV, condição necessária para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, é estimada de 4 a 10% dentre as mulheres infectadas pelo vírus (Bosch *et al.*, 2013). Assim, as etapas essenciais para a carcinogênese da cérvix uterina incluem: 1) infecção do epitélio metaplástico da zona de transformação cervical com um ou mais tipos de HPV de alto risco; 2) persistência viral, ao invés de eliminação; 3) progressão clonal do epitélio persistentemente infectado para o pré-câncer cervical; 4) invasão (Moscicki *et al.*, 2012).

1.2. Infecção viral

Os papilomavírus inicialmente infectam as células epiteliais da camada basal do epitélio estratificado, o qual constitui a única camada em divisão celular ativa em um epitélio normal (Münger *et al.*, 2004). O ciclo de vida viral está, pelo exposto, intrinsecamente ligado ao programa de diferenciação celular do epitélio. O HPV apresenta características únicas ao longo do processo infeccioso, principalmente pela fase produtiva do ciclo viral ser restrita ao epitélio escamoso estratificado em estágio de diferenciação terminal. Adicionalmente, este vírus tem a habilidade de retardar a indução de uma resposta imune efetiva por longos períodos (Schiller *et al.*, 2010). A notável incapacidade dos capsídeos de HPV de ligarem-se ou infectarem o epitélio intacto, mesmo que com apenas uma camada de espessura, pode ter sido desenvolvida para facilitar a infecção preferencial de células basais do epitélio escamoso estratificado (Roberts *et al.*, 2007). Tem-se sugerido como receptor de ligação primária à proteína L1 do HPV os glicosaminoglicanos,

especialmente as proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG) (Drobni *et al.*, 2003). De maneira geral, a interação do capsídio com o HSPG induz alterações conformacionais que resultam na exposição da porção amino-terminal de L2 (figura 2). A exposição desta porção proteica de L2 permite o acesso à sítios de reconhecimento pela furina convertase, promovendo a proteólise de L2 (revisado por Horvath *et al.*, 2010). Acredita-se que a combinação da alteração conformacional e a clivagem promovida pela furina exponham um sítio secundário de ligação em L1, envolvido na internalização infecciosa da partícula viral (Schiller *et al.*, 2010). Estima-se que o tempo de meia-via de internalização do HPV varie entre 4 a 12 horas pós-infecção (Schelhaas *et al.*, 2012).

Figura 2. Mecanismo de infecção pelo HPV (modificado de: revisado por Schiller e Lowy, 2012). Os glicosaminoglicanos atuam como receptores de ligação primária à proteína L1 do HPV induzindo alterações conformacionais que resultam na exposição da porção amino-terminal de L2, permitindo o acesso à sítios de reconhecimento pela furina convertase. A proteólise de L2 (mediada por furina) expõe um sítio secundário de ligação em L1, envolvido na internalização infecciosa da partícula viral.

O mecanismo pelo qual ocorre o escape do complexo endossomal de internalização do HPV e o complexo tráfego entre o citoplasma e o núcleo não está bem elucidado. Porém sabe-se que após a liberação do endossoma, o transporte intracitoplasmático do genoma viral ocorre por microtúbulos até o núcleo e envolve a proteína L2 (Florin *et al.*, 2006).

A infecção inicial pelo HPV ocorre nos queratinócitos basais e indiferenciados. No entanto, altos níveis de amplificação do genoma viral, expressão das proteínas tardias do capsídeo e o ciclo vegetativo completo ocorrem especificamente nas camadas suprabasais do epitélio diferenciado

(revisado por Stubenrauch e Laimins, 1999) (figura 3). Uma vez que o HPV não promove a lise das células hospedeiras, as partículas virais são depositadas dentro das células do epitélio escamoso, as quais são constantemente disseminadas (revisado por Stubenrauch e Laimins, 1999). Lesões pré-malignas associadas à HPV de alto risco representam infecções produtivas, enquanto que tumores são frequentemente não-produtivos, ou seja, as proteínas virais são produzidas, mas a prole viral não é gerada (revisado por McLaughlin-Drubin e Münger, 2009). Embora as células epiteliais diferenciadas não estejam em estágio proliferativo, e logo não produzem enzimas e substratos essenciais para a replicação do DNA, o vírus é capaz de reativar esta maquinaria a fim de replicar seu DNA, sendo as proteínas E6 e E7 responsáveis por este fenômeno (Chow *et al.*, 2010).

Figura 3. Correlação entre o programa de diferenciação celular e o ciclo de vida de HPV (modificado de: Stubenrauch e Laimins, 1999). Após a infecção do epitélio pelo HPV as etapas do ciclo reprodutivo viral, de acordo com a camada em questão, estão indicadas na tabela à direita.

1.3. Proteínas virais precoces

1.3.1. Proteínas E1 e E2

Por ser uma helicase de replicação, a proteína E1 possui um papel central no ciclo de vida viral de maneira que participa de múltiplas interações proteína-proteína e proteína-ácido nucléico visando criar interfaces entre a origem de replicação viral e a maquinaria de replicação do DNA celular (revisado por Bergvall *et al.*, 2013). E1 é expressa durante o estágio precoce do ciclo viral, atuando na promoção do recrutamento de proteínas do complexo de replicação (DNA polimerase α -primase, topoisomerase I, proteína ligante à DNA de simples fita - RPA) (Tsakogiannis *et al.*, 2014). E1 reconhece um segmento específico do genoma viral denominado *ori* ou origem de replicação.

A proteína E2 completa possui atividade regulatória da transcrição e replicação do genoma viral. Esta proteína se liga à sequências específicas de DNA, interagindo com motivos de 12 pares de base localizados na LCR. E2 é expressa em estágios precoces e intermediários do ciclo de vida viral (revisado por McBride, 2013). A expressão da proteína E2 de HPV pode resultar na repressão da transcrição do promotor viral, sendo um dos mecanismos propostos a ligação de E2 na LCR do HPV, bloqueando estericamente o sítio de ligação de Sp1 e TBP (proteína ligadora à *TATA*) (Dostatni *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1994). Assim a interrupção (por integração) do gene *E2* resulta em níveis elevados das oncoproteínas E6 e E7 observadas em células transformadas (revisado por IARC, 2007).

Adicionalmente, a proteína transativadora viral E2 do HPV é necessária para uma eficiente iniciação da replicação do DNA viral, complexando-se com

E1 para que esta se ligue com alta especificidade e afinidade à origem de replicação (Sverdrup *et al.*, 1994).

1.3.2. Proteína E4

A proteína E4 foi inicialmente identificada em HPV-1 e classificada como precoce por sua ORF (região de livre transcrição) estar localizada junto à outros genes precoces (E2 e E1) (Chen *et al.*, 1982; Doorbar *et al.*, 1986). Porém, ainda não foi descrita uma função para esta proteína durante os estágios precoces do ciclo de vida viral (revisado por Doorbar, 2013). A proteína E4 está especificamente envolvida em causar o colapso do citoesqueleto de queratina celular podendo ser esta uma adaptação para um vírus que infecta células epiteliais, potencializando sua capacidade de liberar partículas virais (Doorbar *et al.*, 1991). Ademais foi demonstrado que a proteína E4 de HPV-31 atua na regulação da amplificação do DNA viral e na ativação da expressão de genes tardios em células epiteliais da camada suprabasal (Wilson *et al.*, 2005).

1.3.3. Proteína E5

A proteína E5 tem a capacidade de aumentar a imortalização celular promovida por E6/E7 (Stöppler *et al.*, 1996). A expressão de E5 induz uma gama de alterações celulares, incluindo aumento da sinalização por fatores de crescimento, ativação da via de *MAPK* (proteína quinase ativada por mitógenos) (Crusius *et al.*, 1997), e alcalinização de endossomas (Straight *et al.*, 1995). Estes mecanismos são responsáveis por desencadear alterações do tráfego no interior dos compartimentos endossomais, potencialmente

interferindo com a apresentação de antígenos virais (Zhang *et al.*, 2003), e alterando significativamente a habilidade de células infectadas pelo HPV de escaparem do sistema imune (Disbrow *et al.*, 2005). Tem-se atribuído como função primária da proteína E5 de HPV-16 a atividade antiapoptótica por sua capacidade de impedir a morte celular desencadeada via *TRAIL* (ligante de fator de necrose tumoral relacionado à indução de apoptose) e *FasL* em queratinócitos humanos primários (Kabsch e Alonso, 2002).

1.3.4. Proteína E6

A integração de sequências do genoma viral no cromossomo celular do hospedeiro resulta na expressão constitutiva de duas proteínas virais, E6 e E7, em tumores cervicais HPV-positivos (revisado por McLaughlin-Drubin e Münger, 2009). Estas oncoproteínas têm como alvo as vias de sinalização de supressão tumoral críticas no controle da proliferação celular (figura 4). A oncoproteína E6 de HPV de alto risco promove a degradação da proteína supressora tumoral P53 via proteólise dependente de ubiquitinação, inibindo a apoptose e os mecanismos de reparo ao dano no DNA (Scheffner *et al.*, 1990).

Os complexos *PAR*, *Scrib* e *Crumbs* são responsáveis por coordenar a transmissão de sinais relacionados à polaridade intra e extracelular para efetores celulares, como redes de citoesqueleto e vias de tráfego de proteínas e RNA (Humbert, 2008). Os papilomavírus oncogênicos têm estes complexos protéicos como alvos de E6. Acredita-se que em certos estágios do ciclo viral a desregulação da polaridade possa fornecer uma vantagem ao vírus, principalmente na fase de infecção, enquanto que durante a progressão

maligna a ruptura do complexo de polaridade pode potencializar a invasão e a metástase (Thomas *et al.*, 2008).

Telômeros são sequências repetitivas dos nucleotídeos TTAGGG nas porções terminais dos cromossomos essenciais para preservar a integridade cromossomal. Os telômeros encurtam-se progressivamente em todas as células humanas desencadeando o processo de senescência celular (revisado por Shay, 2013). A estabilização do comprimento telomérico pela enzima telomerase é um fator necessário para a imortalização celular (Counter *et al.*, 1992). A ativação da telomerase é um componente intrínseco no processo de transformação mediado pela oncoproteína E6 de HPV (Klingelutz *et al.*, 1996). *In vitro*, a proteína E6 de HPV-16 sozinha é capaz de imortalizar células mamárias humanas, enquanto que é necessária a cooperação com a proteína E7 para gerar a imortalização de queratinócitos primários humanos (revisado por McLaughlin-Drubin e Münger, 2009).

Figura 4. Desregulação do ciclo celular desencadeada pelo HPV (modificado de: Leemans *et al.*, 2011). Mecanismos fisiológicos de controle do ciclo celular em resposta a mitógenos, condições de senescência e diferenciação e dano ao DNA. Associados em um contexto onde há expressão das proteínas E6 e E7 de HPV.

1.3.5. Proteína E7

A progressão tumorigênica de lesões associadas à HPV de alto risco é quase sempre acompanhada pela integração física do genoma viral ao cromossomo do hospedeiro, não sendo esta uma manifestação normal do ciclo de vida viral (Münger *et al.*, 2001). A proteína E7 contém em seu domínio amino-terminal duas regiões conservadas (CR1-região conservada 1 e CR2-região conservada 2), e em seu domínio carboxi-terminal uma região globular. Apenas em sua região globular existem motivos de interação para mais de 35 proteínas celulares distintas (figura 5) (Chemes *et al.*, 2012).

Figura 5. Representação esquemática da estrutura da proteína E7 do HPV e seus alvos celulares (Chemes *et al.*, 2012). As diferentes regiões da proteína E7 estão indicadas, assim como as proteínas celulares que foram demonstradas interagir com estas regiões.

A proteína E7 desregula o ciclo celular ao ligar-se e inativar a proteína supressora tumoral pRb (proteína do retinoblastoma) (Münger *et al.*, 1989). A inativação funcional de pRb resulta em uma recíproca superexpressão da proteína supressora tumoral P16^{INK4a} (pertencente a classe das CKI - inibidores de ciclina quinase), sendo este um marcador tumoral de cérvix uterina (Klaes *et al.*, 2001). Os carcinomas de células escamosas de tonsila HPV-positivos também apresentam como marcador biológico comum a interrupção desta via de pRb (revisado por Lajer e von Buchwald, 2010). A habilidade de E7 de impedir as atividades de CKI como P21 e P27 em combinação com a manutenção da inativação dos complexos repressores da família de proteínas E2F, resultam na expressão aumentada de proteínas celulares envolvidas na síntese de DNA e contribuem para a função de E7 na replicação viral (revisado por Münger *et al.*, 2001).

1.4. Proteínas estruturais virais

1.4.1. Proteína L1

A proteína L1 compõe a maior parte do capsídeo viral, contendo cada vírion 360 monômeros de L1 (revisado por Wang e Roden, 2013). A superfície icosaédrica exterior dos vírions é composta de protuberâncias características. Ao todo são 72 capsômeros pentaméricos de L1, uma proteína de 55 kDal (revisado por Buck *et al.*, 2013) (figura 6) com a habilidade de espontaneamente assumir a conformação de capsídeos quando sintetizada através de sistemas recombinantes de partículas virais semelhantes a vírus (VLP, *virus-like particle*) (Kirnbauer *et al.*, 1992).

Figura 6. Estrutura do capsídeo do HPV (à esquerda) (Buck e Trus, 2012) e estrutura tridimensional do capsômero composto por 5 unidades da proteína L1 (à direita) (Buck, Day e Trus, 2013).

Uma das funções destas protuberâncias é acomodar as proteínas L2 que ficam minimamente expostas na superfície viral. A associação entre L1 e L2 está presente na proporção de 5:1, implicando na existência de até 72 sítios de ligação à L2 na VLP (Buck *et al.*, 2008).

Alguns estudos sugerem que em condições de saturação estima-se que de 1 à 2% da superfície da célula infectada esteja ocupada pelas VLP, determinado pela densidade de receptores de sulfato de heparina presentes (Giroglou, 2001), sendo a porção carboxil-terminal de L1 crucial devido à interação relativamente específica com estes receptores HSPG (Joyce, 1999).

A proteína L1, por ser capaz de espontaneamente assumir a conformação de VLP, é expressa em sistemas de leveduras (Lowe *et al.*, 1997) ou em baculovírus (Kirnbauer *et al.*, 1992), e, ao serem adequadamente adicionadas a adjuvantes, desencadeiam respostas imunes protetoras, mimetizando os epítomos virais autênticos. Este sistema desencadeou a geração das vacinas profiláticas contra HPV comercialmente disponíveis desde 2006 (Zhao *et al.*, 2014).

1.4.2. Proteína L2

A proteína codificada pelo gene *L2* apresenta 78 KDal e está envolvida na encapsidação do genoma (Doorbar e Gallimore, 1987). Adicionalmente, devido a sua propriedade de ligação ao DNA, sugere-se que a proteína L2 forme pontos de contato com o genoma viral e com os pentâmeros de L1 (Finnen *et al.*, 2003).

1.5. Taxonomia viral

A atual classificação taxonômica para HPV fornecida pelo Centro Internacional de Referência do Papilomavírus Humano, sediado no Karolinska Institutet (Solna, Suécia) determina que a classificação deva ser baseada na sequência nucleotídica do gene codificante para a proteína L1 do capsídeo

viral. Tipos de HPV pertencentes a diferentes gêneros (alfa-papilomavírus, beta-papilomavírus, gama-papilomavírus) compartilham uma identidade de nucleotídeos de seus genomas menor que 60%; diferentes espécies (alfa-1, alfa-2, alfa-3) dentro de um mesmo gênero compartilham identidades entre 60% e 70%; um novo tipo de HPV apresenta menos de 90% de identidade quando comparado a qualquer outro tipo de HPV já caracterizado (revisado por Bernard *et al.*, 2010; de Villiers *et al.*, 2004; International Human Papillomavirus Reference Center, Karolinska Institutet, 2013).

Na comunidade de pesquisa em papilomavírus convencionou-se que, isolados de um mesmo tipo de HPV são referidos como subtipos quando a sequência nucleotídica da região *L1* difere entre 2% e 10%. Em um nível taxonômico ainda mais refinado, análises filogenéticas têm definido como linhagens de um mesmo tipo (anteriormente designadas como variantes), quando genomas apresentam diferenças entre 1-2% enquanto que sublinhagens de um mesmo tipo, quando apresentam diferenças entre 0,5% e 1%. Este critério para determinação da taxonomia de HPV tem-se provado extremamente útil para pesquisadores de base, clínicos, epidemiologistas e imunologistas (revisado por Burk *et al.*, 2013).

O estabelecimento de uma classificação e de um sistema de nomenclatura coerentes para as linhagens de HPV foi realizado a fim de facilitar a comparação entre os estudos que determinam as sequências de HPV. Cada linhagem foi nomeada utilizando um símbolo alfa-numérico, sendo que a linhagem “A” contém o genoma de referência de cada tipo, enquanto as sublinhagens foram representadas adicionando-se um número posterior ao símbolo alfa-numérico, ex: A1; A2 (Burk *et al.*, 2011) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação do HPV-16 em linhagens e sublinhagens (adaptado de Burk *et al.*, 2013).

Espécie	Tipo	Linhagem	Sublinhagem	Outros Nomes (Variante)
Alfa-9	HPV-16	A	A1	Europeu (E)
			A2	Europeu (E)
			A3	Europeu
			A4	Asiático
		B	B1	Africano-1 (Afr1a)
			B2	Africano-1 (Afr1b)
		C		Africano-2 (Afr2a)
		D	D1	Norte-Americano (NA) 1
			D2	Asiático-Americano (AA) 2
			D3	Asiático-Americano (AA) 1

Análises da história evolucionária destes vírus sugerem que uma estrutura básica de papilomavirus, incluindo cinco genes precoces (*E6*, *E7*, *E1*, *E2* e *E4*) além de 2 genes tardios (*L1* e *L2*), remonta a datas anteriores a cisão das linhagens de répteis primitivos da classe *Reptilia* em duas subclasses *Sinapsida* e *Sauropsida* (Osborn, 1903), há aproximadamente 310 milhões de anos (Herbst *et al.*, 2009). Os papilomavírus apresentam uma taxa evolucionária extremamente baixa e altamente correlacionada com a de seu hospedeiro por utilizarem a maquinaria enzimática celular para replicarem seu genoma. Inferências de substituição nucleotídica em HPV-16 estimaram uma taxa média de $4,94 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano (Firth *et al.*, 2010). As mutações ocorrem ao acaso e podem estabelecer-se em uma população caso haja algum mecanismo que selecione positivamente estes mutantes, ou se eles forem

funcionalmente neutros, por expansão seletiva da população hospedeira infectada com o genoma que contém a mutação (revisado por Bernard *et al.*, 2006).

Os primeiros papilomavírus foram isolados previamente ao desenvolvimento de uma taxonomia formal e de conceitos de espécie viral. Quando um papilomavírus fosse encontrado no mesmo hospedeiro e seu genoma fosse diferente de outros genomas isolados, de acordo com padrões de clivagem por enzima de restrição ou experimentos de hibridização, a identificação deste novo isolado era designada pelo hospedeiro (Ex: *Human*, *Bos taurus*, *Tursiops truncatus*), adicionado ao nome do vírus (papilomavírus) e um número à sua frente (Ex: HPV-1, HPV-2, HPV-3) (revisado por Bernard *et al.*, 2013; Van Doorslaer *et al.*, 2013). Adicionalmente, o genoma viral foi posteriormente classificado em linhagens dentro de cada tipo de HPV, baseado em alinhamentos de sequências da região de LCR. Em particular a evolução de HPV-16 foi associada à origem étnica geográfica das populações (figura 7), indicando que o HPV-16 evoluiu em cinco grandes clados: dois predominantemente presentes na África, dois encontrados principalmente na Ásia e um deles encontrado principalmente na Europa e Índia, sendo designados (Africano: Af1 e Af2; Asiático-Americano: AA; Leste Asiático: As; Europeu: E) (Ho *et al.*, 1993).

Figura 7. Divergência evolucionária e geográfica das linhagens de HPV-16 ao longo da pré-história (Ho *et al.*, 1993).

Subsequentemente, Yamada *et al.*, (1995) ao sequenciar diversos genes (*L1*, *L2*, *E6*) e a LCR de 29 isolados de HPV-16 provenientes dos EUA da América, descreveu uma clado adicional, Norte-Americano (NA). O genoma de referência (protótipo) de HPV-16 foi isolado de uma paciente alemã (Durst *et al.*, 1983). Os estudos referem-se a este genoma como clone de referência de HPV-16. Esta designação substitui o termo protótipo usado em estudos anteriores, pois o termo protótipo pode ser mal interpretado como sendo um genoma viral ancestral, enquanto na verdade, deve ser interpretado como um termo relacionado à prioridade de isolamento, como o primeiro clone de HPV-16 a ser isolado e completamente sequenciado.

O isolado de referência de HPV-18 deriva de uma amostra proveniente de uma paciente do nordeste brasileiro (Boshart *et al.*, 1984). Análises filogenéticas de evolução do HPV-18, baseadas no alinhamento de sequências

de 321bp da LCR e em amostras provenientes de 4 continentes, demonstraram um padrão de “especiação” semelhante ao de HPV-16 (figura 8). A topologia filogenética observada nas árvores construídas sugere a coevolução destes dois tipos virais com os três principais grupos étnicos: Africano (Af), Europeu (E) e Oeste Asiático (As+AI) (Ong *et al.*, 1993).

Figura 8. Árvores filogenéticas de linhagens dos HPV-16 e HPV-18 (Ong *et al.*, 1993).

Com o aumento de tipos de HPV sendo caracterizados filogeneticamente em linhagens e sublinhagens foi observado que para outros tipos virais, HPV-31, 33, 35, 52, 58, e 67 (Chen *et al.*, 2011) as associações de padrão geográfico não são tão nítidas quanto as de HPV-16 e HPV-18. Dada a não existência de um padrão etno-geográfico representativo para este amplo grupo de vírus, Burk *et al.*, (2011), desenvolveram um sistema padrão para a classificação filogenética do HPV (figura 9).

Figura 9. Árvore filogenética representando os tipos e as linhagens/sublinhagens da espécie alfa-9 de HPV (Burk *et al.*, 2013).

A diversidade de linhagens do papilomavírus reflete-se em diferenças de suas propriedades moleculares, biológicas, na sua história natural e em sua patogenicidade (Mammas *et al.*, 2013). Atuais evidências, oriundas de estudos epidemiológicos prospectivos, revelam que estas variações intratípicas de sequências de DNA nos HPV-16 e HPV-18 estão correlacionadas com a persistência viral e a progressão clínica (Cornet *et al.*, 2013, Gheit *et al.*, 2011, Villa *et al.*, 2000).

1.6. HPV e tumores de cabeça e pescoço

Similaridades nas características morfológicas entre as lesões orais e genitais, associadas à presença do HPV, sugerem que a infecção por este vírus possa representar um fator de risco adicional, em relação aos fatores tradicionais como tabaco e álcool, para o desenvolvimento de uma proporção de tumores de cabeça e pescoço. Os HPV infectam diversos sítios na região da cabeça e pescoço, tais como a conjuntiva dos olhos, sinus nasais, cavidade oral e, especialmente, orofaringe e tonsila. A história natural da infecção por tipos oncogênicos de HPV na região de cabeça e pescoço não está bem elucidada. No entanto sabe-se que o HPV encontra-se presente em regiões de mucosa de cabeça e pescoço em uma taxa de 7% em indivíduos sadios (Gillison *et al.*, 2012). No estudo prospectivo da coorte HIM (*HPV in Men*), no qual 1626 homens foram acompanhados ao longo de 12,7 meses (em média), observou-se uma incidência de infecções pelo HPV de 4,4% na cavidade oral durante o período de estudo, sendo que estas infecções persistiram, em média, por 6,9 meses (Kreimer *et al.*, 2013).

Evidências moleculares consistentes e fortes demonstram que o HPV pode ser considerado um agente etiológico de certos tumores de cabeça e pescoço baseados em: 1) frequente detecção do genoma de HPV e da transcrição dos genes *E6* e *E7* em células tumorais; 2) integração do DNA viral no genoma celular de indivíduos acometidos por tumores de células escamosas de cabeça e pescoço; 3) existência de uma considerável carga viral nas lesões (revisado por Gillison *et al.*, 2004), sendo o carcinoma tonsilar na região da orofaringe o que apresenta as mais altas cargas virais, em média $4,13 \times 10^5$ cópias por 50ng de DNA celular. Observou-se também que a

expressão de mRNA de *E6* e *E7* correlaciona-se significativamente com a carga viral de HPV-16 (Deng *et al.*, 2013). No entanto, há estudos contraditórios, onde se demonstra que: (1) Embora 39% dos tumores de cavidade oral apresentem integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, a integração não afeta significativamente os níveis de expressão dos genes *E6* e *E7*, (2) Não são observadas correlações entre os níveis de expressão de mRNA de *E6* e *E7* e a carga viral e, (3) A expressão constitutiva, ao invés da expressão em altos níveis, é necessária para o desenvolvimento dos tumores de cavidade oral associados ao HPV (Olthof *et al.*, 2014).

Os tumores de cabeça e pescoço, incluindo carcinomas de células escamosas de cavidade oral, faringe e laringe são responsáveis por aproximadamente 550.000 novos casos e 300.000 mortes por ano em todo o mundo (GLOBOCAN, 2008). Entre 1984 e 2004 o número de carcinomas de células escamosas de orofaringe HPV positivos aumentou de 16,9% para 71,9% nos Estados Unidos da América, enquanto que a incidência desta doença aumentou 225% (Chaturvedi *et al.*, 2011). Estima-se que caso as tendências de aumento continuem, em 2020 a incidência anual de carcinomas de células escamosas de orofaringe HPV positivo ultrapasse o número anual de cânceres de colo de útero (Caley *et al.*, 2013). As taxas de detecção do DNA de HPV em tumores de células escamosas de cabeça e pescoço são altamente variáveis, sendo esta notável amplitude de prevalência viral entre os estudos atribuída a fatores como: agrupamento de lesões provenientes de subsítios anatômicos distintos, pequeno número de amostras, origem etno-geográfica dos indivíduos analisados e diferenças das técnicas de conservação das amostras (congelamento, fixação em parafina ou raspado oral) (revisado

por Betiol *et al.*, 2013). Adicionalmente, as metodologias de detecção viral utilizadas podem influenciar a prevalência viral mensurada em um grupo de amostras (Shi *et al.*, 2009).

Em 2005, Kreimer *et al.*, revisaram estudos publicados entre 1990 e 2004 relatando a prevalência e distribuição de genótipos de HPV por sítio anatômico em 5.046 tumores de cabeça e pescoço. Foi observada uma prevalência de HPV de 23,5% nos tumores orais, 35,6% nos tumores de orofaringe e 24% nos tumores de laringe. Enquanto em torno de 70% dos tumores de colo de útero seja atribuível ao HPV-16 e HPV-18 (Smith *et al.*, 2007), a relação tipo específica para tumores de cabeça e pescoço é ainda mais evidente, sendo que de 89% a 97% dos carcinomas de células escamosas de orofaringe possuem DNA de HPV-16. O DNA de outros tipos de HPV é raramente detectado neste sítio. Porém, apenas uma fração destes tumores HPV-16 positivos apresenta atividade viral no tecido (ex: detecção de RNA de HPV) indicando que a presença do DNA de HPV *per se* não representa uma prova suficiente do envolvimento causal do HPV nos tumores de orofaringe (Baboci *et al.*, 2013). Adicionalmente, apesar da predominância do HPV-16 nos tumores de cabeça e pescoço, uma recente análise de amostras de raspado oral revelou a presença de um amplo espectro de tipos de HPV dos três principais gêneros: alfa, beta e gama-papilomavírus (Bottalico *et al.*, 2011).

Em 2007, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde concluiu que existem evidências suficientes para considerar a carcinogenicidade do HPV na cavidade oral, orofaringe e tonsilas, enquanto que existem evidências apenas limitadas para considerar a

carcinogenicidade pelo HPV na laringe (revisado por IARC, 2007). Os mais importantes fatores de risco associados ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço incluem o uso de tabaco e álcool, com um efeito sinérgico entre eles (Castellsagué *et al.*, 2004), sendo responsáveis por aproximadamente 70-80% de todos os cânceres orais e de faringe (Blot *et al.*, 1988). A parcela restante dos tumores não é relacionada ao uso de tabaco e álcool, compreendendo um grupo com características distintas quando comparados aos tumores de cabeça e pescoço associados a estes agentes, principalmente por serem constituídos de maioria feminina e acima dos 70 anos (Kruse *et al.*, 2010) (quadro 2).

Quadro 2. Características de tumores de cabeça e pescoço associados a HPV e não associados a HPV (adaptado de Leemans *et al.*, 2011).

Característica	CCECP* HPV negativo	CCECP* HPV positivo
Incidência	Diminuindo	Aumentando
Fator de Risco	Fumo e álcool	(HPV)
Idade	Acima de 60 anos	Abaixo de 60 anos
Mutação em P53	Frequente	Não frequente
Sítio Anatômico Preferencial	Não possui	Orofaringe
Prognóstico	Desfavorável	Favorável

*CCECP- Carcinoma de Célula Escamosa de Cabeça e Pescoço.

Ao menos três grupos distintos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço podem ser assinalados no momento: 1) tumores que contém

o HPV transcricionalmente ativo (em grande parte proveniente de orofaringe, P53 selvagem, positivos para mRNA de *E6* e *E7* e com um prognóstico favorável); 2) tumores HPV negativos com alta instabilidade cromossomal (grande número de alterações numéricas, principalmente aneuplóide e P53 mutado e de pior prognóstico); 3) tumores HPV negativos com baixa instabilidade cromossomal (poucas alterações numéricas, quase diplóides, P53 selvagem e com um prognóstico possivelmente favorável) (Leemans *et al.*, 2011) (figura 10).

Figura 10. Classificação esquemática das características etiológicas e fenotípicas do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Modificado de: revisado por Leemans *et al.*, 2011).

Microscopicamente, os carcinomas de células escamosas de orofaringe são distinguidos pela morfologia (El-Mofty, 2014). Aqueles relacionados ao HPV tendem a ser submucosos e lobulados, com agrupamentos celulares

largos, bem circunscritos, com bordas lisas e pouca reação estromal. Estas células possuem bordas indistintas, de pouca à modesta quantidade de citoplasmas eosinofílicos, e núcleos variando de oval à fusiforme, os quais são hipercromáticos e carecem (ou tem quantidades imperceptíveis) de nucléolo. Existe atividade mitótica perceptível e apoptose abundante. Necrose do tipo comedo também é comum. Diferenciação escamosa de maturação é tipicamente focal ou ausente. Esta aparência morfológica foi caracterizada como não queratinizante (El-Mofty *et al.*, 2008). A distinção é feita claramente entre este tipo tumoral morfológico e o tipo convencional de carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, que é comumente queratinizante, com agrupamentos celulares estrelados e irregulares, com citoplasma eosinofílico abundante, núcleo oval, nucléolo frequente e desmoplasia estromal evidente (Chernock *et al.*, 2009). Foi demonstrado que tipos histológicos não queratinizantes correlacionam-se fortemente com a positividade para HPV e p16 (Lewis *et al.*, 2012).

Enquanto que a maioria dos estudos que analisaram a associação entre linhagens moleculares de HPV e o risco de persistência viral e desenvolvimento de tumor foram realizados em câncer de colo uterino (Schiffman *et al.*, 2010; Sichero *et al.*, 2007), poucos estudos deste tipo foram conduzidos em amostras de cabeça e pescoço. Nos EUA, uma notável similaridade foi observada na distribuição de diferentes linhagens de HPV-16 em amostras de tumores de células escamosas de cabeça e pescoço quando comparadas à distribuição relatada para tumores cervicais. Dentre 253 amostras provenientes de tumores de cabeça e pescoço, foi observada a presença do DNA de HPV em 25% (62/253) destas, sendo o DNA de HPV-16

presente em 90% destes tumores positivos. Os isolados foram alocados na linhagem Europeia (75%), Asiática (17%), Norte-Americana (4%) e Africana (4%) (Gillison *et al.*, 2000). Adicionalmente, a prevalência das diferentes linhagens de HPV-16 em tumores de cabeça e pescoço foi analisada em estudos conduzidos na Europa (Boscolo-Rizzo *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2012). No entanto, análises mais extensivas devem ser realizadas no que concerne à incidência das diferentes linhagens moleculares de HPV-16 em tumores de cabeça e pescoço visando propor um possível impacto prognóstico.

Apesar de tumores oriundos do sítio anatômico de orofaringe representarem diferentes entidades clínicas, quando comparados com tumores oriundos de outros sítios anatômicos, em relação a sua associação com o HPV, os tipos tumorais são atualmente submetidos aos tratamentos sem distinção. Devido às melhores respostas ao tratamento e prognóstico favorável dos pacientes afetados por tumores de cabeça e pescoço HPV positivos, tem-se estudado atualmente uma redução da intensidade do tratamento, a fim de não apenas avaliar a resposta diferencial à terapia, mas também minimizar a toxicidade do tratamento em longo prazo dos tratamentos. (Caley *et al.*, 2013). Adicionalmente, a proposta de redução da toxicidade terapêutica deve preconizar inicialmente a não interferência no sucesso do tratamento, mantendo o melhor prognóstico dos carcinomas de cabeça e pescoço.

Em pacientes afetados por tumores de cabeça e pescoço, a incidência e as taxas de sobrevida relacionadas a tumores secundários associados ao HPV são desconhecidas atualmente. Foi relatado por Joseph *et al.*, (2013), que os tumores secundários na porção contralateral das tonsilas ocorreram com uma incidência de 4% (6/135) em indivíduos afetados por carcinomas primários de

células escamosas tonsilares. Adicionalmente, foi observado que de quatro tumores analisados para a presença do DNA viral, havia concordância de 100% entre a sequência do gene *E6* de HPV-16 observada no tumor primário e no tumor secundário (Joseph *et al.*, 2013).

1.6.1. Tumores de cabeça e pescoço no Brasil

Comparado aos tumores localizados em outros sítios anatômicos, os tumores de cabeça e pescoço são relativamente comuns no Brasil, representando o quarto e o sétimo câncer mais incidente entre homens e mulheres, respectivamente (Pesqueira *et al.*, 2013). As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de incidência de tumores de cavidade oral no Brasil são de 14.170 casos em 2012, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres. Adicionalmente, a mortalidade por este tipo de câncer em 2009 atingiu um total de 6.510 casos, dos quais, 5.136 em homens e 1.394 em mulheres (INCA, 2011; 2009). De acordo com GLOBOCAN, 2012, os tumores de cavidade oral e lábio são os mais prevalentes no Brasil, com 17,21 casos a cada 100.000 habitantes, seguido de tumores de laringe, outros sítios de faringe e o sítio de nasofaringe. Adicionalmente, os tumores de cavidade oral e lábio são também os mais incidentes neste país. O sexo masculino, de maneira geral, é mais acometido pelos tumores de cabeça e pescoço quando comparado com o sexo feminino (tabela 1).

Tabela 1. Prevalência e incidência de tumores de cabeça e pescoço no Brasil em 2012.

Sítio anatômico	Preval. total	Preval. masculino	Preval. feminino	Incidência total	Incidência masculino	Incidência feminino
Cav. oral/lábio	17,21	24,40	10,42	4,88	7,15	2,88
Laringe	13,79	25,05	3,14	3,42	6,60	0,72
Faringe	8,49	14,60	2,72	2,64	4,73	0,82
Nasofaringe	1,34	1,91	0,81	0,38	0,57	0,21

Taxas de prevalência ao longo de 5 anos, em casos por 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2012).

A alta incidência e prevalência de tumores de cabeça e pescoço no Brasil, quando comparado com outros países surpreendem, uma vez que o consumo *per capita* de tabaco no Brasil representa um dos menores níveis dentre todos os países da América Latina e alguns países europeus (Gráfico 1) (Figura 11) (Iglesias *et al.*, 2007)

Gráfico 1. Consumo de cigarro *per capita* na União Européia e Brasil no período de 1970 a 2000. Dados expressos em número de cigarros consumido por ano, *per capita*, incluindo as estimativas de consumo de cigarros de origem ilegal (Iglesias *et al.*, 2007).

Figura 11. Incidência de câncer de cabeça e pescoço na América Latina em 2008. Taxa de incidência por 100.000 indivíduos, padronizada por idade, incluindo câncer de cavidade oral, faringe e lábios (GLOBOCAN, 2008).

1.6.2. Tumores de cabeça e pescoço em São Paulo

No período de 1997 a 2008 foram diagnosticados 473.561 casos de câncer no município de São Paulo, sendo que 54% destes tumores afetaram o sexo feminino. A idade média dos casos foi de 60 anos. As localizações mais frequentes para o sexo masculino foram tumores de pele não-melanoma (22%), próstata (19%) e cólon-reto (8%). Os tumores de laringe foram o oitavo mais frequente, acometendo 2,65% da população, enquanto que tumores de boca foram o décimo terceiro mais prevalente, afetando 1,49% dos indivíduos (RCBP, 2011).

Nos casos de câncer no sexo feminino as localizações anatômicas mais frequentemente acometidas foram a mama (22%), pele não melanoma (21%) e cólon-reto (7%). Os tumores de colo de útero foram o quinto mais comum (4,9%), os tumores de cavidade oral foram o vigésimo primeiro mais frequente, acometendo 0,52% da população feminina, enquanto que os tumores de laringe foram o vigésimo terceiro mais frequente, afetando 0,43% da população (RCBP, 2011).

No município de São Paulo, entre 1997 e 2008, houve diminuição da incidência de tumores de boca e laringe no sexo masculino, enquanto que, para o sexo feminino, a incidência manteve-se mais estável (Gráfico 2). Em tumores de orofaringe, a incidência no sexo masculino apresentou-se em declínio neste período, enquanto que em indivíduos do sexo feminino a incidência elevou-se em aproximadamente duas vezes neste período (Gráfico 2) (RCBP, 2011).

Gráfico 2. Incidência de tumores de orofaringe, tonsila, laringe e boca (em número de casos) diagnosticados no município de São Paulo, Brasil, no período de 1997 a 2008 e de acordo com o sexo dos indivíduos afetados (RCBP, 2011).

1.7. Proteína P16^{INK4a}

Em uma região de aproximadamente 35kb do braço curto do cromossomo 9, banda 21 (9p21), localiza-se o locus *INK4b-ARF-INK4a*, codificador de dois inibidores de ciclina dependente de quinase, p15^{INK4b} e P16^{INK4a}. As proteínas ligam-se especificamente à ciclina dependente de quinase 4 (CDK4) e ciclina dependente de quinase 6 (CDK6), respectivamente, bloqueando a proliferação por manter pRb hipofosforilada e resultando na parada do ciclo celular em G1 (revisado por Popov e Gil, 2010). Em células

normais a transcrição de P16^{INK4a} está epigeneticamente reprimida, entretanto em alguns tumores em humanos, principalmente aqueles causados por HPV de alto risco a expressão de P16^{INK4a} ocorre em altos níveis (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013). A interação da proteína E7 de HPV com a forma hipofosforilada de pRB promove o desacoplamento do complexo supressor de crescimento pRB-E2F, resultando na transição do ciclo celular de G1 para S (revisado por Gonzalez *et al.*, 2001).

Uma vez que pRB atua como regulador negativo da expressão de P16^{INK4a}, a inativação de pRB por E7 resulta na superexpressão de P16^{INK4a}. Como consequência, carcinomas de células escamosas de orofaringe associados ao HPV apresentam superexpressão nuclear e citoplasmática de P16^{INK4a}, a qual é predominantemente ausente neste tipo de tumor HPV-negativo (Langendijk e Psyrri, 2010). Por outro lado, de acordo com o modelo de progressão molecular de tumores de cabeça e pescoço HPV negativos, a perda de heterozigose na região cromossômica 9p aparentemente ocorre durante a fase de displasia, refletindo um evento precoce da carcinogênese não associada ao HPV (revisado por Leemans *et al.*, 2011) (figura 12). Desta maneira a superexpressão de P16^{INK4a} emerge como um potente marcador de infecções ativas (expressão de E7) por HPV, sendo proposto como a metodologia de escolha na detecção de atividade viral ao se trabalhar com amostras tumorais fixadas em formalina e contidas em parafina (FFPE-*formalin-fixed paraffin embedded*) (Smeets *et al.*, 2007). Adicionalmente, a associação da superexpressão de P16^{INK4a} com a infecção pelo HPV têm sido observada de maneira mais evidente em tumores oriundos de orofaringe e tonsilas, enquanto que sua associação com tumores proveniente de outros

sítios anatômicos, como a cavidade oral, não tem demonstrado correlação estatisticamente significativa (Nemes *et al.*, 2006).

Figura 12. Proposta de um modelo integrado de carcinogênese molecular para os tumores de células escamosas de cabeça e pescoço. Esquematização de três categorias de tumores de cabeça e pescoço (HPV⁺, HPV⁻ e alta CIN e HPV⁻ e baixa CIN) e suas respectivas consequências na regulação gênica do hospedeiro. Adicionalmente está descrito a evolução das lesões em cada etapa da carcinogênese. CIN - Instabilidade cromossomal. (revisado por Leemans *et al.*, 2011).

No entanto, P16^{INK4a} pode apresentar-se superexpressa devido à mecanismos não relacionados ao HPV, levando a um resultado falso-positivo. Adicionalmente, tumores de cabeça e pescoço apresentam com grande frequência deleções na região do gene P16^{INK4a}, podendo gerar um resultado interpretado como negativo, porém sem correlação com os mecanismos inerentes ao HPV (Walline *et al.*, 2013). Mooren *et al.*, (2014), relataram que a superexpressão de P16^{INK4a} apresenta-se como um marcador confiável de

infecções por HPV-16 em tumores de orofaringe e displasias de tonsilas, no entanto em lesões benignas e pré-malignas de tonsila e laringe, positivas para HPV de baixo risco (HPV-6 e HPV-11), o mesmo não foi observado. Adicionalmente, foi demonstrado que ao comparar tumores oriundos de diversos sítios anatômicos de cabeça e pescoço, aqueles que eram provenientes de orofaringe apresentaram a maior chance de risco de superexpressar P16^{INK4a}, quando comparado com tumores oriundos de cavidade oral, laringe e hipofaringe, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Combes e Franceschi, 2013). As variabilidades relacionadas ao uso de P16^{INK4a} como um marcador indireto de infecção ativa pelo HPV podem estar relacionadas a fatores como: (1) metodologia de amostragem tumoral (biópsia ou ressecção cirúrgica, microarranjo tecidual ou análise em fatias do tecido) e armazenamento (FFPE ou congelamento a fresco); (2) técnica de detecção do DNA viral (PCR, FISH, Luminex) ou RNA viral (qRT-PCR, Luminex) por possuírem diferentes sensibilidades e especificidades; (3) uso de diferentes anticorpos anti- P16^{INK4a}, reagentes e protocolos de imunohistoquímica; (4) interpretação não padronizada da coloração da reação de imunohistoquímica anti- P16^{INK4a}; (5) superexpressão de P16^{INK4a} devido à mecanismos independentes de E7 de HPV (Wasylyk *et al.*, 2013).

1.8. Vacina profilática

Atualmente estão disponíveis duas vacinas contra o HPV, Gardasil® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, EUA) uma vacina quadrivalente contendo VLP dos tipos 6, 11, 16 e 18 e Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) uma vacina bivalente contendo VLP dos tipos 16 e 18 (revisado por Schiller *et al.*, 2008).

Ambas as vacinas são não infecciosas e não oncogênicas, altamente imunogênicas, induzindo altos picos de títulos de anticorpos, sendo que as taxas séricas destes anticorpos persistem por anos. Até o momento não há relatos de declínio da proteção, sendo demonstrada a manutenção de títulos de anticorpos acima dos níveis observados para infecções naturais, mesmo após 8,4 anos da imunização (Roteli-Martins *et al.*, 2012). Ambas as vacinas são altamente eficazes em prevenir as infecções anogenitais e a subsequente neoplasia causada pelos tipos incluídos nas vacinas (revisado por Schiller *et al.*, 2012).

Resultados mensuráveis da efetividade da vacina têm sido relatados na Austrália onde o programa de imunização iniciou-se em 2007, com a vacina quadrivalente oferecida para garotas de 12 a 13 anos e posteriormente para mulheres de 13 a 26 anos. A taxa de cobertura do programa foi ao redor de 70%, sendo observada uma taxa de redução de verrugas genitais de 90% (Read *et al.*, 2011), enquanto que a redução observada para CIN3+ e adenocarcinoma *in situ* foi de 47,5% (Gertig *et al.*, 2013). Entretanto, não existem, até o momento, relatos no que concerne à prevenção de tumores de cabeça e pescoço.

1.9. Justificativa

Considerando-se pelo exposto:

- 1- A possível influência do HPV no desencadeamento da condição tumoral em sítios anatômicos de cabeça e pescoço;
- 2- A falta de consenso a cerca da prevalência do HPV, bem como dos tipos virais mais prevalentes nas diferentes localizações anatômicas de tumores de cabeça e pescoço;
- 3- O escasso conhecimento em relação à distribuição de linhagens moleculares de HPV-16 nos tumores de cabeça e pescoço;

O presente trabalho propõe-se a auxiliar na elucidação destas questões.

2. OBJETIVO

Caracterizar a diversidade de genomas de HPV em amostras de tumores de cabeça e pescoço provenientes de 2 séries distintas, oriundas do ICESP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

2.1. Objetivos específicos:

2.1.1. Identificar a prevalência dos diversos tipos de HPV em duas séries de amostras oriundas de diferentes localizações anatômicas de tumores de cabeça e pescoço.

2.1.2. Identificar as linhagens moleculares presentes nos casos de tumores contendo o DNA de HPV-16.

2.1.3. Descrever o perfil de expressão de P16^{INK4a} celular nos tumores analisados.

3. METODOLOGIA

3.1. Amostras clínicas

A causuística deste estudo consiste de espécimes emblocados em parafina de casos confirmados de câncer de cabeça e pescoço armazenados nos arquivos patológicos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (n=94, coletados entre 1991 e 2010) e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (n=79, coletados entre 2009 e 2012). Os critérios de inclusão de amostras neste estudo consistiram de confirmação patológica de câncer no tecido selecionado para análise de DNA de HPV, informação do ano de diagnóstico. A lista inicial dos tumores de cabeça e pescoço oriundos do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo possuía 1.159 itens. Desta, foram excluídos casos repetidos ou com ausência de dados do paciente, ou dados incompatíveis com os prontuários dos pacientes, restando 630 amostras que continham todas as informações necessárias para este estudo. Dentre estes, foram selecionados 244 espécimens que apresentaram condições de conservação adequadas e representavam peças cirúrgicas dos respectivos pacientes (e não amostras oriundas de biópsia). Entretanto, apenas 94 foram considerados adequados por serem passíveis de amplificação de um fragmento de 110pb do gene humano de beta-globina, além de possuírem confirmação patológica de tumor no tecido selecionado para análise,

No que concerne aos tumores de cabeça e pescoço oriundos do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), a lista inicial contendo todos os dados necessários para inclusão neste estudo e compatíveis com os

prontuários dos respectivos pacientes, era composta de 109 casos de tumores de cabeça e pescoço. Destes, 79 foram considerados adequados por serem passíveis de amplificação de um fragmento de 110pb do gene humano de beta-globina e por possuírem confirmação patológica de tumor no tecido selecionado para análise. Cabe ressaltar que neste grupo de amostras, nenhum paciente foi submetido à tratamento prévio (químico ou radioterapia).

Todos os protocolos foram submetidos aos Comitês de Ética de ambas as Instituições participantes. Entre 10 e 20 cortes sucessivos de 4µm foram obtidos de cada bloco sendo que os primeiros e últimos cortes foram utilizados para a análise histológica após coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes intermediários foram utilizados para a extração de DNA visando à detecção e tipagem do HPV. A revisão da análise histopatológica dos tumores foi realizada pelos serviços de Patologia das Instituições participantes. Os agrupamentos anatômicos das amostras seguiram os padrões sugeridos para a classificação internacional de doenças (WHO, 1992), (figura 13).

Figura 13. Agrupamento de sítios anatômicos para categorização de tumores de cabeça e pescoço.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se a metodologia que envolve a utilização de mistura de fenol-clorofórmio. Inicialmente, os tecidos contidos em parafina foram tratados com 750µL de Xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha), homogeneizados e centrifugados por 15 minutos a 12.000rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido a etapas sucessivas de homogeneização e centrifugação, conforme descrito acima, com 500µL de etanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e posteriormente com 500µL de etanol 50% (Merck, Darmstadt, Alemanha). O *pellet* foi mantido em temperatura ambiente até a secagem total. Ao tecido deparafinado foram adicionados 300µL de solução de Proteinase-K SDS a 0,1% e incubado a 55°C sob

agitação de 300rpm por 48 horas. Após a digestão do tecido, foram adicionados 300µL de solução de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico 25:24:1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), o tecido digerido foi homogeneizado vigorosamente por 1 minuto e centrifugado por 15 minutos a 12.000rpm. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 100µL de solução de acetato de amônio a 7,5M e 800µL de etanol 100% para precipitação do DNA por 2 horas a -80°C. Após este período o material foi centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos a 4°C, sendo em seguida o sobrenadante descartado e o *pellet* submetido a duas lavagens com etanol 70%. Ao final o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido em temperatura ambiente para secagem. O DNA extraído foi ressuspenso em 20µL de água deionizada e destilada. As alíquotas de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop®, Waltham, EUA) a 260nm. Todas as amostras foram diluídas a 50ng/µL a fim de evitar variabilidade nos dados gerados atribuíveis à quantidade de DNA utilizada nas diferentes reações de PCR. Adicionalmente, a fim de verificar a qualidade e suficiência do DNA, um fragmento do gene humano da beta-globina de aproximadamente 110pb foi amplificado utilizando-se os iniciadores PCO3/PCO4 conforme descrito (Saiki *et al.*, 1988).

3.3. Diagnóstico viral e genotipagem

A metodologia escolhida para a detecção do HPV, bem como para a genotipagem viral, foi a de hibridização reversa, utilizando-se o *kit* INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (INNOGENETICS, Gent, Bélgica). Este método

possibilita a identificação de 28 genótipos distintos de HPV. Brevemente, fragmentos de 65pb da região *L1* do HPV foram amplificados utilizando os iniciadores SPF10 biotinilados em uma reação de PCR (Kleter, *et al.*, 1998, 1999). Em seguida, 10µL do produto de PCR foi desnaturado pela adição de 10µL de solução de NaOH (concentração não descrita na bula do kit utilizado, citado apenas como solução denaturante contendo NaOH). Após 10 minutos, uma tira de Inno-LiPA foi recoberta com 2mm de tampão de hibridização [3x SSC (1x SSC é composto de citrato de sódio, $C_6H_5Na_3O_7$, 15mM e de cloreto de sódio, NaCl, 150mM) e 0,1% de dodecil sulfato de sódio, $NaC_{12}H_{25}SO_4$, (pré-aquecido a 37°C)] e incubados a $50 \pm 0,5^\circ C$ por 1 hora. Todas as incubações e etapas de lavagem foram realizadas de maneira automatizada em AutoBlot3000 (MedTec, Inc. Chapel Hill, EUA). As tiras foram lavadas duas vezes por 30 segundos e uma vez por 30 minutos a 50°C com 2mL de solução de hibridização. Após esta lavagem estridente, as tiras foram incubadas com 2mL de fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina por 30 minutos em temperatura ambiente. As tiras foram lavadas duas vezes com 2mL de solução de enxágue e uma vez com 2mL de tampão de substrato. Dois milímetros (aproximadamente 2mL) de substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato e nitroazul de tetrazólio) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela aspiração da solução de substrato e adição de 2mL de água destilada. Após a secagem, os resultados da tira foram interpretados pela comparação do padrão de hibridização com o diagrama modelo de padrões tipo específicos de HPV (anexo 7.1) (figura 14) (Kleter *et al.*, 1999).

Figura 14. Diagrama do teste de Inno-LiPA. A primeira e última fileira correspondem ao gabarito mostrando a localização onde as sondas HPV tipo-específicas foram imobilizadas. Estão apresentadas 18 amostras (tiras 1 a 18), 1 controle positivo (tira 19) e 1 controle negativo (tira 20). Observa-se, por exemplo, na tira 11, a presença de HPV-16 devido à hibridização da amostra amplificada com a sonda oligonucleotídica imobilizada na altura da linha 3.

3.4. Análise de linhagens moleculares de HPV-16

Visando amplificar uma região do genoma viral que possuísse uma densidade de polimorfismos característicos de cada linhagem, foram desenhados iniciadores específicos (tabela 2,3). A menor região que delimitasse uma quantidade de polimorfismos suficiente para a classificação filogenética dos isolados virais foi escolhida. Uma vez que as amostras clínicas estavam contidas em parafina, técnica de conservação que induz altos níveis de fragmentação no DNA, os iniciadores foram contruídos de maneira a amplificar fragmentos menores que 200pb (Specht *et al.*, 2001). Desta maneira,

o amplicon possui tamanho próximo ao do fragmento de beta-globina utilizado como controle de suficiência e qualidade do DNA extraído. Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a sequência do genoma de referência de HPV-16 depositada no GenBank (K02718, National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA)

Tabela 2. Iniciadores construídos para análise de linhagens de HPV-16.

Iniciador/ Região Viral	Senso	Antisenso	Tamanho fragmento
HPV-16/LCR	CTAACCTAATTGCATATTTGG Posição: nt.7724 - nt. 7744	ACGCCCTTAGTTTTATACATG Posição: nt. 13 - nt. 33	213nt
HPV-16/LCR	CTGAATCACTATGTACATTGT GTC Posição: nt.7629 - nt. 7652	GGCCTTAGAAGTTTAAACC Posição: nt.7750 - nt. 7768	139nt
HPV-16/E6	AGCAGACATTTTATGCACCA Posição: nt. 71 - nt. 90	TAGTTGTTTGCAGCTCTGTG Posição: nt. 151 - nt. 170	99nt
HPV-16/E6	AGAGATGGGAATCCATATGC Posição: nt.266 - nt. 285	GCTGTTCTAATGTTGTTCCATAC Posição: nt.352 - nt. 374	108nt

Tabela 3. Mutações características de cada linhagem, localizadas na região amplificada pelos iniciadores descritos na tabela 2. Pontos indicam que não houve alterações nucleotídicas em comparação com o protótipo. Nucleotídeos separados por barra podem ser ambos, encontrados na mesma posição, para uma mesma linhagem. Eur, Europeu; As, Asiático; AFR, Africano; NA, Norte Americano; AA, Asiático-Americano (Cornet *et al.*, 2012).

Linhagem	E6												LCR								Variante
	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	4	6	6	7	7	7	7	7	7	7	
	0	3	3	4	4	7	8	8	9	3	5	0	6	8	2	3	4	6	8		
	9	1	2	3	5	8	6	9	5	5	0	3	9	9	9	0	3	4	6		
Prototype	T	A	G	C	G	T	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	C	C		
A1/A2	/C	/G	.	.	.	/A	.	.	.	/T	/G	.	.	.	.	/C	.	.	.		Eur
A3	.	.	.	.	.	G/C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.		As
B1	.	.	C	G	T	.	A	G	.	T	.	.	.	A	.	.	.	T	T		AFR1a
B2	.	G	.	G	T	.	A	G	G	T	G	.	.	A	.	.	.	T	T		AFR1b
C1	C	.	T	G	T	.	A	G	.	T	.	G	T	/A	.	.	.	T	T		AFR2a
C2	.	.	.	G	T	.	A	G	.	T	.	.	T	A	.	.	.	T	T		AFR2b
D1	.	.	.	.	T	.	A	G	.	T	G	.	T	A	/C	.	.	T	T		NA
D2	.	.	.	.	T	.	A	G	.	T	G	.	T	A	C	.	G	T	T		AA-1
D3	.	.	.	.	T	.	A	G	.	T	G	.	T	A	C	.	.	T	T		AA-2

A determinação das posições de início e término das regiões gênicas a serem amplificadas do HPV-16 foi realizada com o auxílio do site *PAVE* (Van Doorslaer *et al.*, 2013). A análise de estabilidade física, térmica e química dos iniciadores foi realizada com o auxílio da ferramenta *Oligoanalyzer 3.1* (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA).

3.4.1. PCR tipo específica

Inicialmente, 3 μ L de DNA a 50ng/ μ L extraído das amostras biológicas HPV-16 positivas por INNO-LiPA, foram utilizado na reação de PCR empregando-se os iniciadores específicos. Resumidamente, 40 ciclos de amplificação foram efetuados em um volume de reação de 50 μ L contendo 200 μ M de cada dNTP, 4mM de MgCl₂, 1,25U de AmpliTaq Gold polimerase (Perkin-Elmer, Califórnia, EUA) e 0,3 μ M de cada iniciador. Cada ciclo incluiu 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de alongamento da cadeia a 72°C. O primeiro ciclo foi precedido por 10 minutos de desnaturação a 94°C e o último ciclo foi estendido por 8 minutos de alongamento a 72°C. Foram incluídos sempre controles positivos e negativos na reação. O controle positivo usado foi DNA de plasmídeo contendo o genoma completo de HPV-16. Como controle negativo foi incluído na reação de PCR um tubo com a mistura de reação, porém sem DNA. Os produtos de PCR positivos foram submetidos à clonagem seguida de sequenciamento.

3.4.2. Clonagem e sequenciamento

Os produtos de PCR foram inseridos no vetor pCR™2.1-TOPO® e clonados utilizando-se o TOPO TA Cloning® kit for Sequencing (Invitrogen, Califórnia, EUA) conforme instruções do fabricante. Em seguida, o produto desta ligação foi transformado em bactérias *E.coli* DH-5 α tornadas termocompetentes de acordo Sambrook e Russell (2006). Após choque térmico por 2 minutos a 42°C e posterior resfriamento por 1 minuto em gelo, as bactérias transformadas foram incubadas em meio L.B. (Luria-Bertani, 1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura e 1g de NaCl, por 100mL de H₂O) líquido

por 1 hora a 37°C, e agitação a 150rpm. Posteriormente estas foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar contendo ampicilina (100µg/mL), IPTG (0,1mM) e X-gal (0,003%), a 37°C, por aproximadamente 16 horas. Assim foi possível a seleção de colônias contendo o plasmídio ligado ao fragmento de DNA de interesse. As colônias selecionadas foram crescidas em meio L.B. líquido contendo ampicilina (100µg/mL) por aproximadamente 16 horas a 37°C sob agitação de 150rpm. O DNA plasmidial destas colônias foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Plus Miniprep DNA Purification System (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os DNA purificados foram submetidos ao sequenciamento empregando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (AB Applied Biosystems, Califórnia, EUA) em um sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (AB Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A identidade das sequências geradas foi realizada por comparação com sequências depositadas no banco de dados GenBank utilizando-se o sítio <http://pave.niaid.nih.gov/#home>. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta *Bioedit* 7.2.5 (Tom Hall - Ibis Bioscience, California, EUA).

3.5. Análise dos níveis da proteína P16^{INK4a}

Os níveis de P16^{INK4a} das amostras de tumores de cabeça e pescoço foram analisados utilizando-se o kit CINTec® P16^{INK4a} Histology (Roche MTM Laboratories, Heidelberg, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. As reações de imunohistoquímicas foram realizadas no equipamento Ventana Benchmark GX (Roche, Califórnia, EUA) disponível no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano (INCT-HPV, São

Paulo, Brasil). A análise das colorações das reações de imunohistoquímica foi realizada no Departamento de Patologia do ICESP. Foram dados escores para as colorações observadas de acordo com o número total de células coradas: Escore 0 - (negativo); Escore 1 - ($\leq 10\%$ das células coradas); Escore 2 - ($\leq 25\%$ das células coradas); Escore 3 - ($\leq 75\%$ das células coradas) e Escore 4 - ($> 75\%$ das células coradas) (Figura 15).

3.6. Seleção de amostras

Em relação à amostras da Santa Casa foi elaborado, inicialmente, um catálogo pela equipe do departamento de cabeça e pescoço dessa Instituição, no qual foram inclusas informações de cada atendimento em que foi realizada biópsia ou cirurgia de suspeita de carcinoma espinocelular e/ou epidermóide. A partir deste catálogo foram selecionados somente os casos que contivessem informações sobre o procedimento realizado. Dentre os blocos selecionados do arquivo patológico da Santa Casa, foram incluídos no presente trabalho apenas aqueles que consistissem de peças cirúrgicas e com diagnóstico histopatológico confirmado de tumor de cabeça e pescoço.

As amostras oriundas do ICESP compreenderam todos os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço oriundos do sítio anatômico de boca, orofaringe, laringe e hipofaringe removidos cirurgicamente entre 2009 e 2010. Adicionou-se a esta casuística alguns casos operados em 2011 e 2012. Foram incluídos no estudo apenas os indivíduos que não foram submetidos à tratamento prévio por quimioterapia e/ou radioterapia.

4. RESULTADOS

4.1. Série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

A idade média dos pacientes analisados foi de 59,9 anos (mediana: 58,0 anos; intervalo: 39-87 anos). Dentre os pacientes analisados 86,1% eram do sexo masculino com idade média de 59,1 anos (mediana: 57,4 anos; intervalo: 39-85 anos). Ademais 13,8% das amostras analisadas eram oriundas de pacientes do sexo feminino com idade média de 64,5 anos (mediana: 63,0 anos; intervalo: 45-87 anos). (Tabela 4)

Tabela 4. Idade e sexo dos indivíduos que compuseram as séries de tumores analisadas.

Idade				
	n	Média	Mediana	Intervalo
Santa Casa				
Total	94	59.9	58.0	39-87
Feminino	13	64.5	63.0	45-87
Masculino	81	59.1	57.5	39-85
ICESP				
Total	97	63.4	61.5	43-91
Feminino	28	68.6	68.0	43-91
Masculino	66	61.2	59.0	44-86

*Em 5 indivíduos do sexo masculino oriundos da série santa casa, não há dados relativos a idade.

**Em 3 indivíduos oriundos da série ICESP, não há dados relativos a idade ou gênero.

4.1.1. Amostras analisadas por subsítio anatômico

Foram analisadas neste estudo 94 amostras de tumores de cabeça e pescoço provenientes da Santa Casa. A maioria das amostras deriva de carcinomas de células escamosas localizados na laringe (62,8%), seguido de cavidade oral (23,4%) e orofaringe (11,7%). Uma das amostras oriunda de laringe e/ou palato e uma amostra oriunda de faringe e/ou valécua foram classificados como sítio não definido (gráfico 3).

Gráfico 3. Proporção de amostras analisadas por sítio anatômico (n=94), série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

4.1.2. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica.

Nesta série foi observada a presença de DNA de HPV em 13,8% (13/94) das amostras analisadas. A localização anatômica que apresentou a maior proporção do DNA viral foi a cavidade oral (18,1%; 4/22). Seguem-se na ordem decrescente de presença do DNA viral os sítios de laringe (13,6%) e orofaringe (9,1%). Os intervalos de confiança relativos à prevalência de DNA viral foram calculados para cada um dos sítios anatômicos, demonstrando que todos eles se sobrepõem e desta maneira, não são diferentes entre si (tabela 5).

Em relação à distribuição de tipos de HPV encontrados nesta série, observou-se que o HPV-16 foi o mais prevalente, encontrado em 61,5% (8/13) dos tumores HPV positivos (tabela 5). Seguindo-se em ordem decrescente de positividade tipo-específica, o HPV-11 foi encontrado em 15,4% (2/13) dos tumores que continham o DNA viral, enquanto que os HPV-52 e HPV-35 foram encontrados cada um em 7,7% (1/13) das amostras positivas para HPV. Adicionalmente uma amostra foi classificada como PSNI (positivo não identificado) pois esta apenas hibridizou-se com a sonda oligonucleotídica genérica para HPV, não sendo possível identificar o tipo viral presente nesta amostra pela metodologia de INNO-LiPA (tabela 5).

Tabela 5. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica na série de tumores oriundos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Localização Anatômica	Prevalência HPV n - % (I.C. 95%)	Prevalência HPV tipo-específica				
		HPV-16	HPV-11	HPV-52	HPV-35	PSNI
Total (n=94)	13/94 – 13,8% (6,9% – 21,0%)	8/13 (61,5%)	2/13 (15,4%)	1/13 (7,7%)	1/13 (7,7%)	1/13 (7,7%)
Cav. Oral (n=22)	4/22 – 18,1% (1,9% – 34,0%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Orofaringe (n=11)	1/11 – 9,1% (0% – 25,9%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
Laringe (n=59)	8/59 – 13,6% (4,4% – 21,5%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)
Mista ** (n=2)	0/2 – 0% (0% – 0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)

*PSNI – Positivo não identificado. Amostra hibridizou com a sonda genérica apenas.

**Mista – Devido à extensão tumoral não foi possível determinar o sítio primário.

4.1.3. Perfil de expressão de P16^{INK4a} celular

Foi observado que nesta série, 35% (31/89) das amostras tumorais de cabeça e pescoço apresentaram-se positivas para a expressão de P16^{INK4a}, independente da presença de DNA viral. Dentre as amostras de tumores de cabeça e pescoço que continham o DNA de HPV, 31% (4/13) apresentaram-se positivas para a expressão de P16^{INK4a} por imunohistoquímica. Não foi observada uma relação clara entre a presença de DNA viral e o aumento da intensidade da expressão de P16^{INK4a} (gráfico 4). Entretanto observa-se que entre o grupo de amostras HPV positivas, o escore 4 de marcação de P16^{INK4a} foi mais representativo.

Gráfico 4. Perfil de expressão de P16^{INK4a} dentre as amostras oriundas de tumores de cabeça e pescoço provenientes da série Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

P16 entre as amostras HPV negativas (n=76)

■ Score 1 ■ Score 2 ■ Score 3 ■ Score 4 ■ Negativas

P16 entre as amostras HPV positivas (n=13)

■ Score 1 ■ Score 4 ■ Negativas

Escore 0 **Escore 1** **Escore 2** **Escore 3**

Escore 4

Figura 15. Sistema adotado de escore para a avaliação por imunohistoquímica da expressão de p16INK4a em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (aumento de 100x).

4.1.4. Linhagens moleculares de HPV-16 - Santa Casa

Foram analisadas ao nível taxonômico de linhagens as amostras em que se detectou o DNA de HPV-16 por Inno-LiPA. Foi possível realizar a análise taxonômica de linhagens em 6 amostras HPV-16 positivas oriundas desta Instituição. Destas, 83% (5/6) foram alocadas na linhagem de referência Européia (E, linhagem A1), enquanto que 17% (1/6) das amostras foram alocadas na linhagem Norte-Americana/Asiático-Americana (NA/AA, linhagem D) (Figura 16 e 18).

Figura 16. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado de três amostras (53, 79 e 105) HPV-16 positivas oriundas da série de tumores provenientes da Santa Casa. Alinhamento da região de 213pb da LCR de 3 amostras HPV-16 positivas. Ressaltado em vermelho na figura o SNP na posição nucleotídica 7764 intrínseco das linhagens Européia e Asiática. Outros SNP excluíram a possibilidade destas amostras alocarem-se no clado das Asiáticas.

4.2. Série de tumores oriundos do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP

A idade média dos pacientes analisados foi de 63,3 anos (mediana: 61 anos; intervalo 43-91 anos). Dentre os pacientes analisados 67,1% eram do sexo masculino com idade média de 60,7 anos (mediana: 58,5 anos; intervalo 44-86 anos). Ademais 32,9% das amostras analisadas eram oriundas de pacientes do sexo feminino com idade média de 68,3 anos (mediana: 66,0 anos; intervalo 43-91 anos) (Tabela 4).

4.2.1. Amostras analisadas por subsítio anatômico

Foram analisadas neste estudo 79 amostras de tumores de cabeça e pescoço provenientes do ICESP. A maioria das amostras (74,7%) deriva de

carcinomas de células escamosas localizados na cavidade oral, seguido de orofaringe (17,7%), laringe (7,6%) (gráfico 5).

Gráfico 5. Proporção de amostras analisadas por sítio anatômico, n= 79, série de tumores oriundos do ICESP.

4.2.2. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica.

Nesta série foi observada a presença de DNA de HPV em 24,1% (19/79) das amostras analisadas. A localização anatômica que apresentou a maior proporção do DNA viral foi a cavidade oral com 27,1% (16/59) de positividade. Os tumores provenientes de orofaringe apresentaram uma positividade de 21,4% (3/14) de DNA de HPV. Os intervalos de confiança foram calculados

para cada um dos sítios anatômicos demonstrando que todos eles se sobrepõem e desta maneira não são diferentes entre si (tabela 6).

Em relação à distribuição de tipos de HPV observados nesta série, o HPV-16 foi o mais prevalente, encontrado em 74% (14/19) dos tumores HPV positivos, sendo 93% em infecções simples (13/14) e 7% (1/14) em infecções múltiplas pelos HPV 16/18 e possivelmente o HPV-39. Os tipos de HPV que não foram incluídos no desenvolvimento das sondas específicas são determinados como possíveis infecções quando ocorre hibridização de maneira inespecífica com as sondas representativas de outros tipos de HPV. Isto ocorre para o HPV-18, onde o HPV-39 está possivelmente presente como co-infecção. Devido a esta limitação do método, os resultados para HPV-39 observados neste estudo devem ser considerados apenas como possivelmente positivos.

O HPV-18 e possivelmente o HPV-39 foram encontrados em 16% (3/19) dentre os tumores que continham o DNA viral, sendo que 67% (2/3) destas correspondem a amostras que continham o DNA de HPV-18 e possivelmente HPV-39, enquanto que 33% (1/3) continham o DNA de HPV-16/18 e possivelmente HPV-39 (tabela 6). Seguindo a ordem decrescente de positividade tipo-específica, segue-se o HPV-58 (em possível co-infecção com o HPV-52), HPV-6 e HPV-74, presentes cada um deles em 5% (1/19) das amostras. Ao analisar a positividade tipo-sítio específica, observou-se que em todos os sítios anatômicos, exceto a laringe, o HPV-16 foi o mais prevalente (tabela 6).

Tabela 6. Prevalência de DNA de HPV e prevalência tipo-sítio-específica na série ICESP.

Localização Anatômica	Prevalência HPV tipo-específica							
	Prevalência HPV	HPV-16	HPV-18	HPV-39**	HPV-52**	HPV-58	HPV-6	HPV-74
	n - % (I.C. 95%)							
Total (n=79)	19/79 – 24,1% (14,6% – 33,4%)	14/19 (74%)*	3/19 (16%)*	3/19 (16%) **	1/19 (5%) **	1/19 (5%) *	1/19 (5%)	1/19 (5%)
Cav. Oral (n=59)	16/59 – 27,1% (15,8% – 38,4%)	11/16 (69%)*	3/16 (19%)*	3/16 (19%)**	1/16 (6%)**	1/16 (6%)*	1/16 (6%)	1/16 (6%)
Orofaringe (n=14)	3/14 – 21,4% (0% – 42,9%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
Laringe (n=6)	0/6 – 0% (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)

*Infecções Múltiplas, dentre as 19 amostras HPV positivas, 2/19 (11%) continham o DNA de HPV-18 e 39; 1/19 (5%) continham o DNA de HPV-16, 18 e 39; 1/19 (5%) continham o DNA de HPV-52 e HPV-58.

**A classificação dos tipos de HPV pela metodologia de INNO-LiPA obedece ao padrão linha-tipo específico, presente no diagrama de interpretação fornecido pelo fabricante (anexo 1). Possivelmente existirá um determinado tipo de HPV na amostra analisada quando, devido a todas as sondas já terem sido utilizadas para detectar especificamente outros tipos de HPV, ocorrer hibridização nas linhas representativas para: HPV-18 (HPV-39); HPV-31 (HPV-52), (HPV-54); HPV-33 (HPV-52), (HPV-54); HPV-40 (HPV-52); HPV-53 (HPV-52); HPV-56 (HPV-74); HPV-58 (HPV-52); HPV-68 (HPV-39) e HPV-73 (HPV-39), (HPV-68). Os genótipos entre parênteses estão possivelmente presentes como co-infecção. Devido à esta limitação do método, os resultados para HPV-39 observados neste estudo devem ser consideradas como possivelmente positivos.

4.2.3. Perfil de expressão de P16^{INK4a} celular

Foi observado que nesta série de tumores, 14,9% (11/74) das amostras tumorais de cabeça e pescoço apresentaram-se positivas para a expressão de P16^{INK4a} independente da presença de DNA viral. Dentre as amostras de tumores de cabeça e pescoço que continham o DNA de HPV, 33% (6/18)

apresentaram-se positivas em relação a expressão de P16^{INK4a}. Não foi observada uma relação clara entre a presença de DNA viral e o aumento da intensidade da expressão de P16^{INK4a} (gráfico 6). Entretanto observa-se que entre o grupo de amostras HPV positivas, o escore 4 de marcação de P16^{INK4a} foi mais representativo.

Gráfico 6. Perfil de expressão de P16^{INK4a} dentre as amostras oriundas de tumores de cabeça e pescoço provenientes da série ICESP.

4.2.4. Linhagens moleculares de HPV-16 - ICESP.

Foi possível realizar a análise taxonômica de linhagens de HPV-16 em 12 amostras HPV-16 positivas oriundas desta Instituição. Pode ser observado que 67% (8/12) pertencem alinhagem Norte Americana/Asiático Americana

(NA/AA, linhagem D), enquanto que 33% (4/12) eram oriundas da linhagem de referência Européia (E, linhagem A1) (Figura 17,18).

Figura 17. Alinhamento da sequência nucleotídica da região de 99pb do gene E6 de 4 amostras HPV-16 positivas. As amostras alinhadas foram: 2, 14, 19 e 29. Ressaltado em vermelho na figura o SNP na posição nucleotídica 145, intrínseca da linhagem Asiático-Americano quando apresenta T (timina) e Européia quando apresenta G (guanina).

Figura 18. Árvore filogenética adaptada de Cornet et al., (2012) representando a distribuição de linhagens de HPV-16 .

5. DISCUSSÃO

5.1. Prevalência de HPV nas amostras de tumores de cabeça e pescoço

Nas 173 amostras analisadas neste estudo foi observada uma prevalência de DNA de HPV nos tumores de cabeça e pescoço de 18,5%. Em um dos estudos do tipo meta-análise mais amplos realizados até o momento, no qual foram compilados 60 estudos de 26 países diferentes, totalizando 5.046 amostras de tumores de cabeça e pescoço, foi relatada uma prevalência de HPV que variava entre 20 a 30% (Kreimer *et al.*, 2005). Adicionalmente, outro estudo baseado em PCR, que analisou 253 tumores de cabeça e pescoço, relatou 25% de prevalência de DNA de HPV em tumores de cabeça e pescoço (Gillison *et al.*, 2000). No entanto, um estudo que está sendo

conduzido no Instituto Catalão de Oncologia – ICO, Barcelona, Espanha (Estudo internacional de detecção de HPV e distribuição genotípica em tumores de cabeça e pescoço), que envolve mais de 4.000 amostras provenientes de 30 países, diagnosticadas a partir de 1990, relatou após analisar 1.593 tumores de cabeça e pescoço uma prevalência de DNA de HPV de 8,7%. Ademais, considerando-se apenas os tumores oriundos do sítio de faringe e orofaringe combinados, a prevalência de DNA de HPV foi de 17% (Castellsagué *et al.*, 2013).

Foi observada neste estudo a presença majoritária do HPV-16 dentre as amostras HPV positivas, independentemente da série analisada. No estudo que esta sendo conduzido pelo ICO também é observada a maior prevalência de HPV-16 (67%) dentre as amostras que continham o DNA viral (Castellsagué *et al.*, 2013). A predominância do HPV-16 nos tumores de cabeça e pescoço associados ao vírus é também relatada na maioria dos estudos em tumores provenientes de cabeça e pescoço (revisado por IARC 2007).

Por outro lado, outros tipos de HPV são encontrados em baixas taxas de positividade. No estudo ICO, os HPV-33, 52, 35 e 51, estavam presentes em 2,9% dos tumores cada um. No presente estudo o HPV-18 foi o segundo tipo viral mais prevalente enquanto os HPV-52, 58, 6, 74, 11 e 35 foram detectados com baixa prevalência.

Foi relatada uma baixa prevalência de DNA de HPV (8,8%) em um estudo utilizando-se tumores de cabeça e pescoço provenientes do Brasil e da América Latina, sendo que o HPV-16 foi detectado em 40% dos tumores HPV positivos (López *et al.*, 2014). Neste, as amostras provenientes do Brasil, emblocadas em parafina (n=200) foram analisadas por Inno-LiPA

(Innogenetics, Gent, Bélgica) e as amostras oriundas da América Latina, congeladas a fresco (n=198) foram analisadas por PCR utilizando-se os iniciadores genéricos PGMY09/11, que amplificam um fragmento de 450pb do gene *L1* de um amplo espectro de tipos de HPV (Gravitt *et al.*, 2000). Adicionalmente em outro estudo realizado na América do Sul (Brasil e Argentina) em que 507 amostras congeladas a fresco de tumores de cabeça e pescoço foram analisadas por PCR utilizando-se os iniciadores PGMY09/11, observou-se uma prevalência de 0,6% de DNA de HPV (Ribeiro *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi realizada PCR tipo específica para HPV-16 em uma parcela destes tumores (n=196), e foi observada uma prevalência de 3,1% de DNA de HPV-16.

A comparação direta entre os estudos não é adequada, uma vez que as séries de tumores analisadas são heterogêneas no que concerne à população analisada e à metodologia empregada para a detecção do DNA viral. Este fato possivelmente influencia as prevalências de DNA de HPV observadas não apenas nos estudos realizados no Brasil, mas também entre os estudos conduzidos mundialmente (tabelas 7 e 8).

Um estudo recente indica que características como gênero, idade, etnia e hábitos de prática de sexo oral, influenciam significativamente a prevalência de HPV-16 na cavidade oral (D'Souza *et al.*, 2014). Cabe ressaltar que o presente estudo visou primordialmente analisar a distribuição de HPV em tumores de cabeça e pescoço de maneira descritiva, não possuindo casuística suficiente para ajustar e padronizar a prevalência de DNA viral de acordo com as características e comportamentos sexuais dos indivíduos.

Tabela 7. Estudos de prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço conduzidos no mundo.

Autor	Região Geogr.	Método	Amostra	Sítio Anatômico (n)	Prevalência Viral
D'Souza <i>et al.</i> , 2007	EUA	ISH	FFPE	Orofaringe (100)	72,0%
Chaturvedi <i>et al.</i> , 2011	EUA	Inno-LiPA	FFPE	Orofaringe (263)	44,0%
Gillison <i>et al.</i> , 2000	EUA	PCR-MY	congelada	Orofaringe (60)	57,0%
				Cavidade Oral (84)	12,0%
				Laringe (86)	19,0%
Herrero <i>et al.</i> , 2003	9 países	PCR-GP	FFPE e congelada	Orofaringe (142)	18,3%
				Cavidade oral (766)	3,9%
Kreimer <i>et al.</i> , 2005	26 países	Meta-análise (60 estudos distintos)	Heterogêneo	Orofaringe (969)	35,6%
				Cavidade oral (2.642)	23,5%
				Laringe (1.435)	24,0%
Castellsagué <i>et al.</i> , 2013	29 países	PCR-SPF10 - InnoLiPA	FFPE	Faringe (507)	17,0%
				Cavidade Oral (617)	6,5%
				Laringe (469)	3,0%

Tabela 8. Estudos de prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço conduzidos no Brasil.

Autor	Região Geogr.	Método	Amostra	Sítio Anatômico (n)	Prevalência Viral
Ribeiro <i>et al.</i> , 2011	Argentina e Brasil	PCR (PGMY)	congelada	Orofaringe (136)	0,7%
				Cavidade Oral (132)	0%
				Laringe/Hipofaringe (239)	0,8%
López <i>et al.</i> , 2014	Brasil	Inno-LiPA (FFPE)	200 FFPE	Orofaringe (91)	6,6%
		PCR-PGMY (congelada)	198 congelada	Cavidade Oral (121)	6,6%
				Laringe (142)	12,7%
				Hipofaringe (44)	6,8%
Kaminagakura <i>et al.</i> , 2012	Brasil	PCR (GP)	FFPE	Cavidade Oral (114)	19,2%
Betiol <i>et al.</i> , em preparação	Brasil	Inno-LiPA	FFPE	Cabeça e Pescoço (191)	18,9%
				ICESP	
				Boca (70)	27%
				Orofaringe (17)	18%
				Laringe (6)	0%
				Santa Casa	
				Boca (22)	18%

Orofaringe (15)	7%
Laringe (56)	14%

5.1.1. Prevalência de HPV em cavidade oral

Ao compilar as duas séries que compõem este estudo, a maior quantidade de amostras analisadas advém da cavidade oral, da qual foram analisadas 81 amostras. O DNA de HPV foi detectado em 24,7% (20/81) destas amostras. Separadamente, na série de tumores oriundos de cavidade oral, foram observadas prevalências de HPV de 18% (4/22) e 27,1% (16/59) nos tumores provenientes da Santa Casa e do ICESP, respectivamente. Estes dados corroboram a meta-análise realizada por Kreimer *et al.*, (2005) que ao agrupar 35 estudos que totalizaram 2.642 amostras de tumores de cavidade oral, observou uma prevalência de 23,5% de DNA de HPV. No entanto, estudos multicêntricos como o conduzido por Herrero *et al.*, (2003) analisaram 766 tumores de cavidade oral, sendo relatada uma prevalência de DNA de HPV de 3,9%. Neste estudo o DNA de HPV foi detectado por PCR utilizando-se os iniciadores genéricos GP5+/GP6+, capazes de amplificar um fragmento de 150pb do gene *L1* de diferentes tipos de HPV. No estudo internacional conduzido pelo ICO, até o momento foram analisados 617 tumores de cavidade oral, e foi observada uma prevalência de 6,5% de DNA de HPV neste sítio anatômico (Castellsague *et al.*, 2013). Estudos realizados no Brasil relatam, de maneira geral, uma prevalência entre 3% e 6% em cavidade oral (Lopez *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2011). Entretanto, Kaminagakura *et al.*, (2012) descreveram uma prevalência de HPV em tumores de cavidade oral de 19,2%.

Mesmo quando restringe-se a comparação à estudos realizados no Brasil, a ampla variação observada nas taxas de prevalência de HPV nos diferentes sítios anatômicos de cabeça e pescoço indicam que fatores como variabilidades a cerca de hábitos sexuais, distribuição de etnias, gênero e idade, podem interferir na prevalência de DNA viral.

5.1.2. Prevalência de HPV em laringe

A casuística deste estudo foi composta de 65 amostras de laringe, dentre as quais 12,3% continham o DNA viral. Separadamente, na série de tumores oriundos de laringe provenientes da Santa Casa, foi observada uma prevalência de HPV de 13,6% (8/59). Entre os tumores provenientes do ICESP, foi encontrada a presença do DNA viral em 0% (0/6) das amostras analisadas. Para esta localização anatômica, a prevalência observada é inferior à descrita por Kreimer *et al.*, (2005) que relatou em meta análise uma prevalência de 24% ao compilar 35 estudos, contendo ao todo 1.435 tumores de laringe. Por outro lado, a positividade observada neste estudo é maior quando comparada com as taxas observadas pelo estudo ICO, no qual foi relatada uma prevalência de DNA de HPV de 3% em tumores de laringe quando a análise de 469 amostras (Castellsague *et al.*, 2013).

No que concerne a prevalência de HPV em tumores oriundos de laringe no Brasil foram realizados até o momento 3 estudos. Miguel *et al.*, (1998) não detectaram DNA viral em nenhuma das 7 amostras de tumor de laringe analisadas. Mais recentemente, Ribeiro *et al.*, (2011) descreveram uma prevalência de DNA de HPV de 0,8% neste sítio anatômico. Por outro lado, de

acordo com Lopez *et al.*, (2014) uma prevalência de 12,7% foi observada após a análise de 142 amostras tumorais de laringe.

Cabe ressaltar que as amostras oriundas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, compreenderam em grande parte tumores de sítios primários de laringe, uma vez que estas amostras foram coletadas à até 20 anos atrás, quando o principal tratamento para este tipo de neoplasia consistia de cirurgias ablativas, não conservadoras. Enquanto que, na série de tumores oriundos do ICESP, uma pequena proporção de tumores de laringe são encontrados, uma vez que estas amostras foram coletadas mais recentemente, sendo que atualmente o tratamento para estes tumores tende a ser mais conservador, preconizando terapias não ablativas quando possível. Como as amostras foram selecionadas de maneira oportuna, a disponibilidade de peças cirúrgicas influenciou na composição final das duas séries analisadas.

5.1.3. Prevalência de HPV em orofaringe

No que concerne os tumores de cabeça e pescoço, as maiores taxas de prevalência de DNA de HPV são encontradas na orofaringe. Entretanto, a falta de consenso a cerca do agrupamento de sítios sub-anatômicos que compõem a orofaringe, como o fornecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992), impossibilita a comparação direta entre as prevalências observadas nos diferentes estudos. Cabe ressaltar que não apenas para a orofaringe, mas também em todas as outras localizações anatômicas de cabeça e pescoço, observa-se a falta de padronização, ou o agrupamento realizado de maneira

arbitrária dos subsítios anatômicos. Este fator poderia em parte explicar os resultados discrepantes observados mundialmente (revisado por Betiol *et al.*, 2013). Por exemplo, o subsítio anatômico da base da língua é arbitrariamente agrupado com o subsítio de orofaringe, separando-o do subsítio anatômico de língua. Entretanto, um estudo conduzido por Dahlgren *et al.*, 2004, indicou que em base de língua foi encontrada uma prevalência de DNA de HPV de 40%, enquanto que em outras porções da língua, a taxa de detecção de HPV foi de 2,3%. Assim, a inclusão do subsítio anatômico da base da língua, no subsítio anatômico da língua, induziria a interpretação de que, em toda a porção da língua a prevalência de HPV encontra-se aumentada (40%).

No presente estudo, o sítio anatômico de orofaringe englobou amostras oriundas de base da língua, região tonsilar, úvula, palato mole, parede posterior da orofaringe e valécua (figura 13). No total foram analisadas 25 amostras de orofaringe neste estudo e foi observada uma prevalência de 16% de DNA viral. Separadamente, nas séries de tumores oriundos de orofaringe provenientes da Santa Casa, foi observada uma prevalência de HPV de 9,1% (1/11), enquanto que entre os tumores provenientes do ICESP foi encontrada a presença do DNA viral em 21,4% (3/14) das amostras analisadas. Herrero *et al.*, (2003) descreveram uma positividade de 18% de HPV ao analisar 142 tumores de orofaringe oriundos de 9 países distintos. Adicionalmente, os resultados observados até o momento na série de tumores de cabeça e pescoço do ICO, revelaram uma prevalência de HPV de 21,8% entre 507 tumores provenientes de orofaringe (Castellsague *et al.*, 2013). Kreimer *et al.*, (2005) descreveram uma taxa de positividade de HPV de 35,6% ao compilar 969 tumores de

cabeça e pescoço oriundos de orofaringe, provenientes de 27 estudos diferentes realizados em todo o mundo (Tabela 7).

Em relação aos estudos conduzidos no Brasil, as taxas de positividade de DNA viral relatadas para tumores de orofaringe são inferiores a 7% (Lopez *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2011). O pequeno número de amostras oriundas de orofaringe analisadas neste estudo impede que comparações sejam realizadas com outros estudos, não permitindo a identificação de fatores de risco que possam explicar a prevalência observada.

5.2. Linhagens moleculares de HPV-16

Estudos descritivos acerca da prevalência de diferentes linhagens de HPV em uma população, bem como as associações destas linhagens com fatores clínicos como progressão, persistência de lesão e associação com tumores, foram realizados quase que exclusivamente em sítios anatômicos anogenitais, principalmente em amostras de colo de útero (Sichero *et al.*, 2007; Villa *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 1998; Zehbe *et al.*, 1998).

Na Europa, onde a maior parte das amostras de HPV-16 oriundas da região genital feminina pertence à linhagem Européia, foi inicialmente sugerido que um polimorfismo no gene *E6*, na posição 350 (350 T>G) está associado com maior risco de persistência viral. Neste estudo realizado por Londesborough *et al.*, (1996) que analisou prospectivamente ao longo de 2 anos, 42 mulheres HPV-positivas, por citologia e colposcopia, relatou que mulheres portadoras da linhagem Européia de HPV-16 que continham este polimorfismo apresentaram maior persistência da infecção quando comparado com as mulheres portadoras da linhagem Européia de HPV-16 que não

continham este polimorfismo. No entanto esta mesma associação não foi observada em todas as populações européias analisadas (Zehbe *et al.*, 1998).

Dados oriundos de um estudo epidemiológico prospectivo, o qual acompanhou por aproximadamente 10,8 anos, 261 mulheres nas quais foi detectado o DNA de HPV-16 em amostras de esfregaço cervical, indicaram que as linhagens de HPV-16 sem o polimorfismo apresentavam um maior risco (OR=2.06, 95% CI, 1.04-4.25) de persistência e progressão quando comparadas com as linhagens HPV-16 E6-350G (Gheit *et al.*, 2011). Mais recentemente, um estudo epidemiológico prospectivo, o qual acompanhou por 7,7 meses em média, 142 mulheres com diagnóstico positivo para HPV-16 em colo de útero e citologia inicial normal, apesar de sugerir uma maior chance de persistência na linhagem sem o polimorfismo, não atingiu diferenças estatisticamente significantes (OR=1.6, 95% CI=0.8-3.4) em relação a sua associação com a persistência e/ou progressão de lesões de colo de útero (Cornet *et al.*, 2013). No Brasil foi observado uma associação estatisticamente significativa de linhagens não-Européias de HPV-16 persistirem e estarem mais associadas com o desenvolvimento de lesões pré-invasivas de alto grau (HSIL) em colo de útero (Villa *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2007).

Independente da instituição de origem, dentre as amostras HPV-16 positivas analisadas neste estudo, 9/18 (50%) foram alocadas no clado da linhagem Europeia. Enquanto que o restante 9/18 (50%) foram alocadas no clado das linhagens Asiático Americana/Norte Americana, a qual demonstrou-se mais persistente e mais associada ao desenvolvimento de lesões de colo de útero no estudo de Villa *et al.*, 2000.

Adicionalmente, é interessante ressaltar que ao analisar os dados, segregando as amostras de acordo com a Instituição de origem (Santa Casa ou ICESP), foi observado que ocorre uma distribuição distinta das linhagens moleculares de HPV-16 entre as Instituições, com a série de amostras HPV-16 positivas provenientes do ICESP apresentando maior proporção (67%) de amostras pertencentes às linhagens Asiático Americana/Norte Americana. Por outro lado, dentre as amostras oriundas da Santa Casa, apenas 17% pertenciam a esta linhagem.

Os resultados obtidos nas amostras oriundas da Santa Casa estão de acordo com os dados de Gillison *et al.*, (2000) que analisaram 52 amostras de tumores de cabeça e pescoço HPV-16 positivas oriundas dos Estados Unidos e observaram que 75% dos isolados pertenciam à linhagem Européia, 17% à linhagem Asiática, enquanto que as linhagens Norte-Americanas e Africanas contribuíram com 4%, cada uma. Estes dados corroboram um estudo prévio conduzido com amostras de colo uterino nos Estados Unidos em que foi observado que 77% (17/22) dos isolados de HPV-16 pertenciam à linhagem Européia, 18% (4/22) pertenciam à linhagem Africana e 5% (1/22) pertencia à linhagem Asiática (Ho *et al.*, 1993). Entretanto, mais recentemente, Yamada *et al.*, (1997) relatou a presença quase totalitária (93,3%) da linhagem do ramo Europeu entre tumores de colo de útero nos Estados Unidos.

Diferenças na distribuição das linhagens virais são esperadas devido à:

- (1) As regiões geográficas em que foram realizados os estudos são distintas;
- (2) A composição étnica dos indivíduos analisados é heterogênea;
- (3) As diferentes características de colonização e migração dos indivíduos analisados.

5.3. Expressão da proteína P16^{INK4a} celular

Em ambas as séries não foram observadas diferenças em relação à superexpressão de P16^{INK4a} de acordo com o resultado de HPV das amostras de tumores de cabeça e pescoço. No entanto, ao comparar o grupo de tumores HPV-positivos expressando P16^{INK4a}, com o grupo de tumores HPV-negativos que também expressam P16^{INK4a}, foi observado que os níveis de expressão altos desta proteína (>75% ou Escore 4) estão em maior proporção no grupo de amostras tumorais HPV-positivas em ambas as séries. Em um estudo recente, o qual analisou 338 tumores de cabeça e pescoço provenientes de indivíduos dos Estados Unidos, foi descrita uma prevalência de HPV em orofaringe de 86%, 50% em nasofaringe e 26% em cavidade oral. Em relação à expressão de P16^{INK4a} houve uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a presença do DNA viral e a expressão de P16^{INK4a} celular (Walline *et al.*, 2013). Adicionalmente, Wang *et al.*, (2013) compilaram estudos dos últimos 5 anos, relacionando a expressão de P16^{INK4a} celular em tumores de orofaringe e foi observado que a sensibilidade variava de 46% à 98% entre os estudos. A superexpressão de P16^{INK4a} foi observada em 3 à 51% dos tumores HPV negativos, enquanto que 2 à 54% dos tumores HPV positivos apresentavam-se negativos para a expressão de P16^{INK4a} celular (tabela 9) .

Tabela 9. Expressão de P16^{INK4a} celular em tumores de orofaringe de acordo com o status de HPV (adaptado de Wang *et al.*, 2013).

Estudo	Total (n)	P16+/HPV+ (sensibilidade, %)	P16+/HPV- (falso positivo, %)	P16- /HPV+ (falso negativo, %)	P16- /HPV- (especificidade, %)	Deteção de DNA de HPV	Padrão de expressão de P16 (IHC)
Shi <i>et al.</i>	111	61/62 (98)	8/44 (18)	2	82	ISH	Nuc. e Cito. ^a
Gao <i>et al.</i>	150	54/55 (98)	22/43 (51)	2	49	ISH	Nuc. e Cito. ^b
Thavanaj <i>et al.</i>	142	88/90 (98)	2/52 (4)	2	96	ISH ou PCR	Nuc. e Cito. ^c
Lewis <i>et al.</i>	239	158/163 (97)	29/76 (38)	3	62	ISH ou PCR	Nuc. e/ou Cito. ^d
Jordan <i>et al.</i>	235	138/143 (97)	27/89 (30)	3	70	ISH	Sem dados ^e
Evans <i>et al.</i>	30	20/22 (91)	2/4 (50)	9	50	PCR	Sem dados ^f
Nasman <i>et al.</i>	175	119/136 (88)	4/35 (11)	12	89	PCR	Sem dados ^g
Hong <i>et al.</i>	198	62/83 (75)	3/115 (3)	25	97	PCR	Nuc. e Cito. ^h
Junor <i>et al.</i>	254	77/133 (58)	4/51 (8)	42	92	PCR	Nuc. e/ou Cito. ⁱ
Holzinger <i>et al.</i>	199	42/92 (46)	12/85 (14)	54	86	PCR	Nuc. e Cito. ^j

Adicionalmente, no estudo de Wang *et al.*, (2013) pode-se observar que a interpretação do resultado de P16^{INK4a} apresenta-se como um fator que possivelmente influencia na inconsistência da correlação entre a presença do DNA de HPV em tumores de cabeça e pescoço e a expressão de P16^{INK4a} celular: (a) P16^{INK4a} positivo quando o sinal é detectado em ambos, núcleo (neu) e citoplasma (cyto); (b) P16^{INK4a} positivo quando há >50% de células demonstrando marcação nuclear ou citoplasmática; (c) P16^{INK4a} positivo quando há marcação forte e difusa em >70% das células tumorais, enquanto qualquer outro padrão de marcação é considerado negativo; (d) classificação por escore de acordo com o número de células positivas (0, negativo; 1+, 1-

25% de células positivas; 2+, 26-50%; 3+, 51-75%; 4+, 76-100%); (h) marcações focais fracas foram consideradas negativas; (i) a classificação foi feita em negativo, positivo focal e positivo, baseado em ambos, marcação nuclear e citoplasmática. Marcações nucleares e citoplasmáticas difusas e contínuas foram consideradas positivas. (j) P16^{INK4a} positivo quando apresenta marcações nucleares e citoplasmáticas fortes em células tumorais proliferativas (tabela 9).

Pelo exposto, a divergência dos estudos realizados até o momento que buscam a associação da expressão de P16^{INK4a} com a presença viral em tumores de cabeça e pescoço, poderia ser explicada, ao menos em parte, pela ausência da padronização da interpretação dos resultados de imunohistoquímica para P16^{INK4a}. Adicionalmente, uma vez que a expressão de P16^{INK4a} está, possivelmente, em alguns casos associada à atividade viral, os fatores que influenciam os resultados de prevalência de HPV nos diferentes sítios anatômicos dos tumores de cabeça e pescoço impactam nos resultados observados de P16^{INK4a}.

6. CONCLUSÃO

Este estudo descreve uma prevalência de aproximadamente 18,5% de DNA de HPV em tumores de cabeça e pescoço oriundos de duas Instituições distintas. Nestas amostras, não foi observada relação direta entre a detecção de DNA de HPV e a superexpressão de P16^{INK4a}, independente de analisarmos as séries agrupadas ou separadas, ou de categorizarmos as séries de acordo

com a localização anatômica da amostra analisada. Entretanto, altos níveis de P16^{INK4a} (escore = 4) foram detectados em maior proporção no grupo de amostras que continham o DNA viral. Foi possível observar que a distribuição de DNA de HPV em diferentes sítios anatômicos de cabeça e pescoço, embora proporcionalmente diferente, apresenta intervalos de confiança que se sobrepõem, e desta maneira pode-se afirmar, que a presença do DNA de HPV entre os diferentes sítios anatômicos de cabeça e pescoço não é distinta nas séries aqui analisadas. Conforme esperado, o HPV-16 foi o mais prevalentemente detectado nos tumores de cabeça e pescoço HPV positivos. Este tipo viral é observado na grande maioria dos estudos realizados mundialmente, como o tipo predominante.

Nos tumores analisados neste estudo, observou-se maior prevalência de isolados da linhagem Asiático-America dentre as amostras oriundas do ICESP. Entretanto, estudos com um maior número de amostras analisadas ao nível de linhagens moleculares são necessárias, a fim de adquirir força estatística para estabelecerem-se correlações relevantes. Em resumo:

- Dentre as 173 amostras analisadas uma parcela de 18,5% dos tumores de cabeça e pescoço contém o DNA de HPV.
- Embora haja interposição dos intervalos de confiança, em ambas as séries o sítio de cavidade oral apresentou a maior positividade de HPV.
- Na população estudada o HPV-16 foi o tipo mais frequente em todos tumores.

- Na série ICESP, uma maior proporção de linhagem Asiático-Americana de HPV-16 foi observada.
- Nas amostras analisadas, não foi observada correlação entre a presença de DNA de HPV e a superexpressão de p16ink4a.

7. ANEXO

7.1 Diagrama de interpretação - INNO-LiPA.

Interpretation Chart

Probe #	HPV genotypes																																			
	6 LR	11 LR	16 HR	18 HR	18 HR	26* pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	45 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71**	70 LR	70 LR	73 HR	74**	82 HR		
1	X						X																													
2		X																																		
3			X																																	
4				X																																
5					X																															
6						X																														
7																													X							
8							X				X									X				X	X											
9							X	X												X																
10						(X)***	X																													
11									X																											
12				X	X					X																		X				X				
13											X																									
14												X																								
15													X																							
16														X	X																					
17																X																				
18							X	X			X						X		X			X	X	X	X											
19																		X	X																	
20																				X														X		
21																					X				X											
22																						X	X	X	X											
23																										X										
24																											X									
25															X													X			X	X	X			
26																														X	X					
27																																X				
28																																			X	

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

** : 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.

*** : probeline 10 may show weak reactivity when probelines 8 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31

8. REFERÊNCIAS

Baboci L, Boscolo-Rizzo P, Holzinger D, Bertorelle R, Biasini L, Michel A, Schmitt M, Spinato G, Bussani R, Alemany L, Tirelli G, Da Mosto MC, Del

Mistro A, Pawlita M. Evidence of the causal role of human papillomavirus type 58 in an oropharyngeal carcinoma. *Viol J*. 2013;10(1):334.

Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol*. 2013;18:357-61.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9.

Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1071-6.

Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):35–56.

Betiol J, Villa LL, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(3):217-26.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48:3282-7.

Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, Sanjosé Sd; authors of the ICO Monograph 'Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases' Vaccine Volume 30, Supplement 5, 2012. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013;31 (Supl 7):H1-H31.

Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Fuson R, Frayle-Salamanca H, Trevisan R, Del Mistro A. HPV-16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(4):559-66.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 1984;3:1151-7.

Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostoloza J, McKinney S, Sun C, Schlecht NF, Fatahzadeh M, Herrero R, Schiffman M, Burk RD. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis*. 2011; 204(5):787-92.

Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013;445(1-2):169-74.

Buck CB, Trus BL. The papillomavirus virion: A machine built to hide molecular achilles' heels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012;726:403-22.

Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, Trus BL. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2008;82:5190–7.

Burchell A, Richardson H, Mahmud SM, et al. Modelling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol*. 2006;163:534–43.

Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445(1-2):232-43.

Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, Poljak M. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat*. 2011;20(3):113-23.

Caley A, Evans M, Powell N, Paleri V, Tomkinson A, Urbano TG, Jay A, Robinson M, Thavaraj S. Multicentric Human Papillomavirus-associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck*. 2013.

Castellsague X, *et al.* The ICO international study on HPV detection and genotype distribution in head and neck cancer: results on approximately 3,500 samples worldwide. (Apresentado em: 28th International Papillomavirus Conference – Epidemiology/Public Health. 2013. Puerto Rico).

Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, *et al.* The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004;108:741-9.

Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294-301.

Chemes LB, Glavina J, Alonso LG, Marino-Buslje C, de Prat-Gay G, *et al.* Sequence Evolution of the Intrinsically Disordered and Globular Domains of a Model Viral Oncoprotein. *PLoS One*. 2012;7(10):e47661.

Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*. 1982;299(5883):529-34.

Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, Sahasrabuddhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Burk RD. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011;6(5):e20183.

Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010;118(6-7):422-49.

Combes JD, Franceschi S. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2013 (ahead of print).

Cornet I, Gheit T, Clifford GM, Combes JD, Dalstein V, Franceschi S, Tommasino M, Clavel C. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):4.

Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM; IARC HPV Variant Study Group. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012;86(12):6855-61.

Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992;11(5):1921-9.

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

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Högmö A, Björnestål L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;112:1015-9.

de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1-2):2-10.

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

Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, Matayoshi S, Uehara T, Akena S, Yamashita Y, Ogawa K, Maeda H, Suzuki M. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(6):800-8.

Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol*. 2005;79(9):5839-46.

Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013;445(1-2):80-9.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991;352(6338):824-7.

Doorbar J, Gallimore PH. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol*. 1987;61(9):2793-9.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J*. 1986;5(2):355-62.

Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev*. 1991;5:1657–71.

Drobni P, Mistry N, McMillan N, Evander M. Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester labeled papillomavirus virus-like particles fluoresce after internalization and interact with heparan sulfate for binding and entry. *Virology*. 2003;310(1):163-72.

D'Souza G, Cullen K, Bowie J, Thorpe R, Fakhry C. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2014;9(1):e86023.

Du J, Nordfors C, Näsman A, Sobkowiak M, Romanitan M, Dalianis T, Ramqvist T. Human papillomavirus (HPV) 16 E6 variants in tonsillar cancer in comparison to those in cervical cancer in Stockholm, Sweden. *PLoS One*. 2012;7(4):e36239.

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H and Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from

different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A. 1983;80:3812-15.

El-Mofty SK. Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: an update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(4):e377-85. El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM. Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2008;2:163-8.

Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003;77(8):4818-26.

Firth C, Kitchen A, Shapiro B, Suchard MA, Holmes EC, Rambaut A. Using time-structured data to estimate evolutionary rates of double-stranded DNA viruses. *Mol Biol Evol*. 2010;27(9):2038-51.

Florin L, Becker KA, Lambert C, Nowak T, Sapp C, Strand D, Streeck RE, Sapp M. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *J Virol*. 2006;80(13):6691-6.

Genbank. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA.

Gertig DM, Brotherton JM, Budd AC, Drennan K, Chappell G, Saville AM. Impact of a population-based HPV vaccination program on cervical abnormalities: a data linkage study. *BMC Med*. 2013;11:227.

Gheit T, Cornet I, Clifford G, Iftner T., Munk C., Tommasino M., Kjaer S.K.. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:1315–21.

Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7):693-703.

Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet*. 2004;363(9420):1488-9.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. 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.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck V, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001;75:1565–70.

Gissmann L, zur Hausen H. Human papillomavirus: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;73:1310–3.

GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, IARC, Lyon, France, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>.

GLOBOCAN 2008 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. [computer program] International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>.

Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*. 2001;75(16):7583-91.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38:357-61.

Herbst LH, Lenz J, Van Doorslaer K, Chen Z, Stacy BA, Wellehan JF Jr, Manire CA, Burk RD. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology*. 2009;383(1):131-5.

Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ,

Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993;67(11):6413-23.

Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Viol J.* 2010;7:11.

Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Elsum I, Richardson HE. Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene.* 2008;27:6888–907.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2007;90:1–636.

Iglesias R, Jha P, Pinto M, Costa e Silva VL, Godinho J. Tobacco Control in Brazil. Human Development Department – Latin America and the Caribbean Region. The World Bank. 2007.

INCA National Cancer Institute: Estimates of the incidence and cancer mortality in Brazil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>

International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours. 2013. Disponível em: <http://www.uicc.org/resources/tnm>

International Human Papillomavirus Reference Center, karolinska institutet, 2013.

Integrated DNA Technologies, Inc. 1710 Commercial Park Coralville, Iowa 52241 USA. Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

Jaisamrarn U, Castellsagué X, Garland SM, Naud P, Palmroth J, Del Rosario-Raymundo MR, Wheeler CM, Salmerón J, Chow SN, Apter D, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, de Carvalho NS, Germar MJ, Peters K, Paavonen J, Bozonnet MC, Descamps D, Struyf F, Dubin GO, Rosillon D, Baril L; HPV PATRICIA Study Group. Correction: Natural History of Progression of HPV Infection to Cervical Lesion or Clearance: Analysis of the Control Arm of the Large, Randomised PATRICIA Study. *PLoS One*. 2013;8(12).

Joseph AW, Ogawa T, Bishop JA, Lyford-Pike S, Chang X, Phelps TH, Westra WH, Pai SI. Molecular etiology of second primary tumors in contralateral tonsils of human papillomavirus-associated index tonsillar carcinomas. *Oral Oncol*. 2013;49(3):244-8.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*. 1999;274(9):5810-22.

Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*. 2002;76(23):12162-72.

Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, Nishimoto IN, Rocha R, Kowalski LP. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer*. 2012;130(8):1726-32.

Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:12180-4.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of P16INK4A(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001;92(2):276-84.

Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W. 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.

Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B, Quint W. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998;153:1731-9.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 1996;380(6569):79-82.

Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Hildesheim A, Villa LL, Salmerón JJ, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet.* 2013;382(9895):877-87.

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.

Kruse AL, Bredell M, Gratz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head Neck Oncol.* 2010;2:24.

Lajer CB, von Buchwald C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS.* 2010;118(6-7):510-9

Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of P16INK4A overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann Oncol.* 2010;21(10):1931-4.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.

Lewis JS Jr, Khan RA, Masand RP, Chernock RD, Zhang Q, Al-Naief NS, Muller S, McHugh JB, Prasad ML, Brandwein-Gensler M, Perez-Ordóñez B, El-

Mofty SK. Recognition of nonkeratinizing morphology in oropharyngeal squamous cell carcinoma - a prospective cohort and interobserver variability study. *Histopathology*. 2012;60(3):427-36. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer*. 1996;69(5):364-8.

López RV, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, Michaluart-Junior P, Figueiredo DL, Saggioro FP, de Carvalho MB, Kowalski LP, Abrahão M, de Góis-Filho F, Tajara EH, Waterboer T, Boffetta P, Brennan P, Wünsch-Filho V. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*. 2014 [Epub ahead of print].

Lowe RS, Brown DR, J.T. Bryan, J.C. Cook, H.A. George, K.J. Hofmann, W.M. Hurni, J.G. Joyce, E.D. Lehman, H.Z. Markus, M.P. Neeper, L.D. Schultz, A.R. Shaw, K.U. Jansen. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. *J Infect Dis*. 1997;176:1141–5.

Mammas IN, Spandidos DA, Sourvinos G. Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. *Infect Genet Evol*. 2013;21C:220-6.

McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):57-79.

McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K. Tumor suppressor P16INK4A/INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):16175-80.

McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*. 2009;143(2):195-208.

Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg*. 1998;176(5):428-9.

Mooren JJ, Gültekin SE, Straetmans JM, Haesevoets A, Peutz-Kootstra CJ, Huebbers CU, Dienes HP, Wieland U, Ramaekers FC, Kremer B, Speel EJ, Klussmann JP. P16INK4A (INK4A) immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. *Int J Cancer*. 2014;134(9):2108-17.

Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 5):F24-33.

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-60.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20(54):7888-98.

Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989;8:4099-105.

Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of P16INK4A(INK4A), P53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(3):344-52.

Olthof NC, Speel EJ, Kolligs J, Haesevoets A, Henfling M, Ramaekers FC, Preuss SF, Drebber U, Wieland U, Silling S, Lam WL, Vucic EA, Kremer B, Klussmann JP, Huebbers CU. Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One*. 2014;9(2):e88718.

Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype

diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*. 1993;67(11):6424-31.

Osborn HF. The Reptilian Subclasses Diapsida and Synapsida. *Memoirs of the American Museum of Natural History*. Vol. I, Part. VIII. November, 1903.

Pesqueira AA, Goiato MC, Dos Santos DM, Moreno A, Haddad MF, Ribeiro PD, Bannwart LC, Miyahara GI. Patients from the Oral Oncology Center, UNESP, Araçatuba with an indication for prosthesis. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):733-6.

Popov N, Gil J. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics*. 2010;5(8):685-90.

Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2014. [Epub ahead of print].

RCBP – Registro de Cancer de Base Populacional de São Paulo – Brasil. Câncer em São Paulo 1997-2008: Incidência, Mortalidade e Tendência de Câncer no Município de São Paulo. Ministério da Saúde. 2011.

Read TR, Hocking JS, Chen MY, Donovan B, Bradshaw CS, Fairley CK. The near disappearance of genital warts in young women 4 years after commencing a national human papillomavirus (HPV) vaccination programme. *Sex Transm Infect*. 2011;87(7):544-7.

Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*. 2011;40(2):489-502.

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1522-7.

Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med*. 2007;13(7):857-61.

Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillén D, Alfaro M, Morales J, Hutchinson M, Katki H, Cheung L, Wacholder S, Burk RD. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(5):315-24.

Roteli-Martins CM, Naud P, De Borja P, Teixeira JC, De Carvalho NS, Zahaf T, Sanchez N, Geeraerts B, Descamps D. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:390–7.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.

Sambrook J and Russell D. The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent E. coli: High-efficiency Transformation. Cold Spring Harb Protoc. 2006; doi:10.1101/pdb.prot3942

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of P53. *Cell*. 1990;63(6):1129-36.

Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, et al. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.

Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE, Burk RD. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*. 2010;70(8):3159-69.

Schiller JT, Castellsague X, Villa L, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008;26S:K53–61.

Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(10):681-92.

Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 5):F123-38.

Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 2010;118(1 Suppl):S12-7.

Shay JW. Are Short Telomeres Hallmarks of Cancer Recurrence?. *Clin Cancer Res*. 2013. [Epub ahead of print].

Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu FF. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6213-21.

Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*. 2007;120(8):1763-8

Silver HJ, de Campos Graf Guimaraes C, Pedruzzi P, Badia M, Spuldaro de Carvalho A, Oliveira BV, Ramos GH, Dietrich MS, Pietrobon R. Predictors of functional decline in locally advanced head and neck cancer patients from south Brazil. *Head Neck*. 2010;32(9):1217-25.

Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin*. 2012.[Epub ahead of print].

Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for

reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2465-72.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.

Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol*. 2001;158:419–29.

Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology*. 1996;223(1):251-4.

Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol*. 1995;69(5):3185-92.

Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(6):379-86.

Sverdrup F and Myers G. The E1 Proteins-Nebraska Center for Virology. 1997

Sverdrup F, Khan SA. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol*. 1994;68(1):505-9.

Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol*. 2010;21(Suppl 7):vii243-vii245.

Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol*. 1994;68(10):6411-20.

Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaić V, Massimi P, Nagasaka K, Kranjec C, Gammoh N, Banks L. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*. 2008;27(55):7018-30.

Tsakogiannis D, Darmis F, Gortsilas P, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Amoutzias G, Markoulatos P. Nucleotide polymorphisms of the human papillomavirus 16 E1 gene. *Arch Virol*. 2014. [Epub ahead of print].

Vadaparampil ST, Malo TL, Kahn JA, Salmon DA, Lee JH, Quinn GP, Roetzheim RG, Bruder KL, Proveaux TM, Zhao X, Halsey NA, Giuliano AR. Physicians' human papillomavirus vaccine recommendations, 2009 and 2011. *Am J Prev Med*. 2014;46(1):80-4.

Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y, Huyen Y, McBride AA. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D571-8. Ferramenta disponível em: <http://pave.niaid.nih.gov>

Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 12):2959-68.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.

Walline HM, Komarck C, McHugh JB, Byrd SA, Spector ME, Hauff SJ, Graham MP, Bellile E, Moyer JS, Prince ME, Wolf GT, Chepeha DB, Worden FP, Stenmark MH, Eisbruch A, Bradford CR, Carey TE. High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139(12):1320-7.

Wang H, Sun R, Lin H, Hu WH. P16INK4A/INK4A as a surrogate biomarker for human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: consideration of some aspects. *Cancer Sci*. 2013;104(12):1553-9.

Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013;445(1-2):175-86.

Wasylyk B, Abecassis J, Jung AC. Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in P16INK4A should we trust? *Oral Oncol*. 2013;49(10):e33-7.

Wilson R, Fehrman F, Laimins LA. Role of the E1/E4 protein in the differentiation - dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2005;79(11):6732–40.

WHO - World Health Organization. UNICEF, World Bank. State of the world's vaccines and immunization, 3rd ed. Geneva, World Health Organization, 2009.

WHO - World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems. 10th rev. World Health Organization, Washington, DC. 1992

Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, et al. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res*. 1998;58:3839–44.

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:796–802.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71(3):2463-72.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison AS. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*. 1995;69(12):7743-53.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*. 1998;58:829–33.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003;310(1):100-8.

Zhao Q, Potter CS, Carragher B, Lander G, Sworen J, Towne V, Abraham D, Duncan P, Washabaugh MW, Sitrin RD. Characterization of virus-like particles in GARDASIL® by cryo transmission electron microscopy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014;10.

zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(2):F55-78.