

RENATA RODRIGUES ACAY

**DETECÇÃO DO HPV EM LEUCOPLASIAS E CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES ORAIS**

São Paulo

2006

Renata Rodrigues Acay

**Detecção do HPV em leucoplasias e carcinomas
epidermóides orais**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Acay RR. Detecção do HPV em leucoplasias e carcinomas epidermóides orais [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto e Laurenice, que são e sempre serão os principais responsáveis por todas as realizações da minha vida.

Ao meu marido Paulo, cujo apoio foi fundamental para que eu pudesse enfrentar as dificuldades e conseguisse alcançar esse importante objetivo.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, minha orientadora, por todo o incentivo e confiança desde os tempos de iniciação científica e também pela constante boa vontade em orientar e transmitir conhecimento.

Ao Professor Dr. **Fábio Daumas Nunes**, pelos ensinamentos em biologia molecular e pela valiosa contribuição na interpretação dos resultados deste trabalho.

Aos demais Professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, Dr. **Décio dos Santos Pinto Jr.**, Dra. **Marília Trierveiler Martins**, Dra. **Andréa Mantesso**, Dra. **Karem López Ortega** e Dra. **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães**, que serão sempre minha referência, pelos ensinamentos concedidos.

À colega **Nathalie Pepe Medeiros de Rezende**, pela enorme paciência ao me ensinar a técnica de hibridização *in situ* e também pela disponibilidade de ajudar na interpretação dos resultados deste trabalho.

Aos colegas **Arlindo Tadeu Teixeira Aburad**, **Kívia Linhares Ferrazzo**, **Sérgio Alves de Melo Jr.** e **Thais Acquafreda Antunes**, pela presteza e importante contribuição na elaboração deste trabalho.

À colega e grande amiga **Alexandra Fontes da Costa**, por todos esses anos de companheirismo, dividindo momentos alegres e difíceis.

Aos demais colegas da pós-graduação, cujos nomes não listarei para não correr o risco de esquecer alguém, afinal todos, sem exceção, contribuíram de alguma forma durante essa jornada.

À **Elisa dos Santos**, pelo imprescindível auxílio técnico no Laboratório de Patologia Cirúrgica.

À saudosa **Edna Toddai** que, apesar de não ter contribuído diretamente com esse trabalho, é a grande responsável pelo conhecimento que tenho do funcionamento do laboratório, necessário para a realização deste e de muitos outros trabalhos que virão.

Às demais funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal, **Zilda, Néia, Nair, Patrícia e Bia**, por toda a colaboração e atenção sempre que solicitado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de auxílio financeiro.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo financiamento do projeto referente ao estudo do HPV, do qual esse trabalho faz parte.

Ninguém comete erro maior do que não fazer nada porque só pode fazer um pouco.

Edmund Burke

Acay RR. Detecção do HPV em leucoplasias e carcinomas epidermóides orais [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

É ainda bastante controverso na literatura se o HPV pode ou não ser considerado fator etiológico ou de risco para o desenvolvimento de lesões malignas/malignizantes em boca. Já há um consenso de que existe evidência ao menos numérica da relação entre HPV e carcinogênese oral, pois em geral os estudos encontram uma relação de proporção entre grau de malignidade e infecção por HPV – os índices de HPV encontrados em carcinoma epidermóide oral são maiores do que os encontrados em lesões potencialmente malignas, que por sua vez são maiores do que os encontrados em mucosa normal. Sabe-se, porém, que as lesões potencialmente malignas podem apresentar variados graus de displasia epitelial, o que não permite analisá-las como um grupo. Assim, nesse contexto, o objetivo desse estudo foi analisar mais refinadamente a relação entre grau de malignidade e infecção por HPV através da detecção de DNA do vírus em leucoplasias e carcinomas epidermóides orais, desmembrando-se o grupo das lesões potencialmente malignas de acordo com o grau de displasia epitelial. Foram selecionados 50 casos diagnosticados como leucoplasia e carcinoma epidermóide orais, os quais foram divididos em 5 grupos: leucoplasia sem displasia, leucoplasia com displasia discreta, leucoplasia com displasia moderada, leucoplasia com displasia intensa e carcinoma epidermóide. Dados clínicos como idade e sexo do paciente e sítio da lesão foram observados e a presença de DNA de HPV foi

pesquisada através do método CSA-ISH com sonda de amplo espectro. Nos casos positivos para a sonda de amplo espectro foi realizada a genotipagem com sondas específicas para HPV dos tipos 6/11, 16/18 e 31/33. A prevalência de infecção por HPV foi de 24%, notadamente maior que a reportada em mucosa normal, que é de 1 a 2%. Os resultados mostraram uma discreta relação de proporção entre grau de malignidade e os índices encontrados em leucoplasia sem displasia, leucoplasia com displasia e carcinoma epidermóide, porém sem significância estatística. Desmembrando-se o grupo das leucoplasias com displasia, essa proporcionalidade não foi observada entre os grupos. Na genotipagem, a maior positividade foi para a sonda dos tipos 16/18, de alto potencial oncogênico, e a positividade para a sonda 6/11 só foi encontrada nos grupos de menor grau de malignidade. Apenas um caso mostrou positividade para duas sondas (16/18 e 31/33). Não houve correlação significativa entre nenhuma característica clínica e infecção por HPV. Os resultados sugerem portanto que a detecção do HPV não está relacionada com o grau de malignidade das lesões, haja visto a ausência de proporcionalidade entre os índices de detecção do vírus nos grupos analisados. Entretanto, o fato de que a prevalência em nossa casuística, constituída por lesões malignas/malignizantes, foi maior do que àquela encontrada em mucosa normal e que os tipos de alto risco foram os mais prevalentes dentre os casos positivos não nos permite descartar o HPV como fator de risco para a carcinogênese oral.

Palavras-Chave: HPV – carcinoma epidermóide – leucoplasia – carcinogênese oral –
hibridização *in situ*

Acay RR. HPV detection in oral leucoplakia and oral squamous cell carcinoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

It is still highly controversial whether HPV can be considered an aetiological or risk factor for the development of malignant/premalignant lesions of the oral cavity. There is an agreement that there is at least quantitative evidence to relate HPV and oral carcinogenesis, since in general the studies find a proportional relation between degree of malignancy and HPV infection – the prevalence of HPV in squamous cell carcinoma is higher than in premalignant lesions which is higher than in normal mucosa. It is known, however, that premalignant lesions can present several degrees of epithelial dysplasia, which does not allow analyzing them as a group. Hence, in this context, the aim of this study was to analyze more refinedly the relation between degree of malignancy and infection by HPV by means of viral DNA detection in oral leucoplakias and oral squamous cell carcinomas, dividing the group of premalignant lesions according to the degree of epithelial dysplasia within the lesion. Fifty cases diagnosed as oral leucoplakia and oral squamous cell carcinoma were selected and divided into 5 groups: leucoplakia with no dysplasia, leucoplakia with mild dysplasia, leucoplakia with moderate dysplasia, leucoplakia with severe dysplasia and squamous cell carcinoma. Clinical data regarding patients' age and gender and anatomic site of the lesion were observed and the presence of HPV DNA was assessed using CSA-ISH method with a wide spectrum probe. In positive cases to

the wide spectrum probe, genotyping with specific probes to HPV types 6/11, 16/18 and 31/33 was performed. The overall prevalence of HPV infection was 24%, which is higher than the reported for oral normal mucosa, which stands around 1 and 2%. Results show a discrete proportional relation between degree of malignancy and HPV infection indexes found in leucoplakia with no dysplasia, leucoplakia with dysplasia and squamous cell carcinoma, but with no statistical significance. Dividing the group of leucoplakia with dysplasia, this relation of proportion was not observed. In genotyping, most cases were positive to the probe for types 16/18, of high oncogenic potential, and cases positive to the probe for types 6/11, of low oncogenic potential, were only found within groups of lower degrees of malignancy. Only one case was positive for two specific probes (16/18 and 31/33). There was no correlation between clinical features and HPV infection. These results suggest that HPV detection is not related to the degree of malignancy in these lesions. Nevertheless, the fact that the prevalence in these cases, which were all malignant/premalignant lesions, was higher than the one found in oral normal mucosa, and that the high-risk types of HPV were the most frequently found within the positive cases does not allow excluding HPV as a risk factor in oral carcinogenesis.

Keywords: HPV – squamous cell carcinoma – leucoplakia – oral carcinogenesis – in situ hybridization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 – Mapa genômico do HPV tipo 16 (HUBBARD, 2003).....29
- Figura 5.1 – Cortes corados por HE representativos dos grupos 1, 4 e 5 (A, C e E, respectivamente) e cortes apresentando sinal positivo de hibridização para a sonda HPV de amplo espectro em diferentes intensidades, posições e número de células (B, D e F).....47
- Figura 5.2 – Gráfico mostrando a distribuição dos casos positivos para as sondas HPV específicas entre os grupos analisados.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Critérios estabelecidos pela OMS para diagnóstico e classificação de displasia epitelial.....	41
Tabela 5.1 – Dados referentes à idade dos pacientes incluídos no estudo.....	45
Tabela 5.2 – Dados referentes ao sexo dos pacientes incluídos no estudo.....	46
Tabela 5.3 – Sítios afetados pelas lesões analisadas.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDK	do inglês “Cyclin-dependent kinase”, quinase dependente de ciclina
CDKN2	do inglês “Cyclin-dependent kinase inhibitor 2”, gene inibidor de quinase dependente de ciclina
CSA-ISH	do inglês “Catalysed signal amplification for in situ Hybridization”, sistema catalisado de amplificação de sinal para hibridização <i>in situ</i>
DNA	do inglês “Desoxiribonucleic Nucleic Acid”, ácido desoxirribonucléico
EGF	do inglês “Epidermal Growth Factor”, fator de crescimento epitelial
EUA	Estados Unidos da América
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	do inglês “Human Immunodeficiency Virus”, vírus da imunodeficiência humana
HPV	do inglês “Human Papillomavirus”, papilomavírus humano
IAP	do inglês “Inhibitor of Apoptosis Protein”, proteína inibidora de apoptose
ISH	do inglês “in situ Hybridization”, hibridização <i>in situ</i>
NaCl	cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”, reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pRB	proteína do retinoblastoma
RT-PCR	do inglês “Real-time Polymerase Chain Reaction”, reação em cadeia da polimerase em tempo real

TM do inglês "Trade Mark", marca registrada

TRIS tris(hidroximetil)aminometano

USA do inglês "United States of America", Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
p	braço curto de um cromossomo
q	braço longo de um cromossomo
μm	micrômetro
°C	grau Celsius
W	Watts
x	vezes

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Carcinoma epidermóide oral.....	19
2.2 Leucoplasia oral.....	24
2.3 Papilomavírus humano (HPV).....	28
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Casuística e análise morfológica.....	40
4.2 Técnica de hibridização <i>in situ</i>	42
4.3 Análise dos resultados.....	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Dados clínicos.....	45
5.2 Positividade para a sonda de amplo espectro.....	46
5.3 Positividade para as sondas específicas.....	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Dentre as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, o carcinoma epidermóide é a mais freqüente. Milhares de novos casos surgem a cada ano e, apesar de grandes avanços em relação ao seu tratamento, a taxa de sobrevivência se mantém baixa e estável há décadas. Isso se deve principalmente ao fato de que grande parte dos casos não é diagnosticada ou tratada antes que atinja um estágio muito avançado. Programas de prevenção que reduzam fatores de risco e/ou detectem precocemente essas lesões – antes mesmo que a lesão se torne câncer – parecem ser a melhor abordagem.

É aceito na literatura que clinicamente o carcinoma epidermóide pode ser precedido por lesões potencialmente malignas, sendo a leucoplasia a mais comum entre elas. Da mesma forma, histologicamente estágios crescentes de displasia intra-epitelial precedem o surgimento do carcinoma epidermóide.

Há evidências suficientes de que o carcinoma epidermóide é etiologicamente ligado ao uso do tabaco, associado ou não ao consumo de álcool. Mas claramente há pacientes que desenvolvem essa doença sem exposição a esses fatores ou sem nenhum defeito genético óbvio predisponente. Na tentativa de explicar esses casos, outros possíveis fatores de risco foram propostos, dentre eles a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), pela sua relação com o desenvolvimento do carcinoma em colo de útero, região que apresenta mucosa semelhante à mucosa oral. Mas esse ainda é um tópico controverso na literatura.

Quando sucessivos estudos começaram a detectar maiores índices de infecção por HPV em carcinomas epidermóides orais comparados aos de mucosa oral normal, a hipótese de que haveria relação entre HPV e carcinogênese oral se fortaleceu. Imediatamente após, surgiu obviamente a curiosidade de se pesquisar qual seria esse índice em lesões potencialmente malignas, principalmente em leucoplasias, e descobriu-se que o índice de detecção do HPV nestas lesões era em geral intermediário entre o índice de detecção em carcinomas e em mucosa oral, denotando uma linearidade que mostrava proporção direta entre grau de malignidade e infecção por HPV.

Sabemos, contudo, que as lesões potencialmente malignas constituem um grupo muito heterogêneo quanto ao potencial de transformação, de acordo com suas características clínicas e histológicas. Leucoplasias por exemplo podem apresentar histologicamente desde apenas uma hiperqueratose até uma displasia intensa, e tal discrepância não permite agrupar essas lesões. Assim, nesse contexto, no presente estudo nos propusemos a analisar mais refinadamente a relação entre grau de malignidade e infecção por HPV através da detecção de DNA do vírus em leucoplasias e carcinomas epidermóides orais, desmembrando-se o grupo das lesões potencialmente malignas de acordo com o grau de displasia epitelial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide oral

O câncer de boca é o sexto mais prevalente câncer no mundo, sendo o terceiro em países em desenvolvimento e o oitavo em países desenvolvidos (SYRJÄNEN, 2005). Enquanto nos EUA a cavidade oral aparece em décimo-quinto lugar na lista de sítios mais comuns de ocorrência de câncer, no Brasil ela está em sétimo lugar (CARVALHO et al., 2004), provavelmente devido a fatores ambientais e socioeconômicos terem influência no perfil das doenças de uma população (KOIFMAN; KOIFMAN, 2003).

De acordo com estatísticas mundiais da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, no ano de 2000 aproximadamente 267.000 novos casos de câncer de boca foram diagnosticados e cerca de 128.000 mortes por este tipo de câncer foram registradas. Estima-se que pouco mais de 10.000 novos casos de câncer seja diagnosticado em cavidade oral como sítio primário no ano de 2006 em nosso país (BRASIL, 2005), o qual figura entre as áreas de alto risco de incidência desta doença juntamente com Índia, Filipinas, China e outros (SYRJÄNEN, 2005), apesar de outros países, como os EUA, apresentarem maior número absoluto de casos (JEMAL et al., 2006).

O carcinoma epidermóide, também chamado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, responde por mais de 90% de todas as neoplasias que acometem a cavidade bucal. Além de seu aspecto clássico, a OMS

ainda cita outras variantes que podem ser identificadas em boca e/ou orofaringe, bem menos freqüentemente: verrucoso, basalóide, papilífero, acantolítico, adenoescamoso e cuniculatum (BARNES et al., 2005).

A forte associação entre carcinomas epidermóides orais e tabaco é bem estabelecida. Pacientes fumantes apresentam um risco de cinco a nove vezes maior de desenvolver a doença em comparação aos não-fumantes. O risco do hábito de fumar é majoritariamente representado pela exposição direta das células epiteliais do trato aerodigestivo superior às substâncias carcinogênicas liberadas pela fumaça do cigarro em relação dose-efeito, mas o hábito também provoca imunossupressão, o que pode ser um outro fator de risco para o surgimento de neoplasias malignas (MOORE et al., 2001). Outras formas de consumo de tabaco (mastigação ou aspiração) comuns em algumas regiões do mundo, como nos EUA e Escandinávia, também são associadas com o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral, porém com riscos menores comparados ao fumo (NEVILLE; DAY, 2002). O hábito de mascar “Paan” (mistura de folha seca de bétele, fruto da palmeira areca e sumo de limão-galego, com ou sem tabaco e outros condimentos), muito comum na Índia e sudeste asiático por seus efeitos de euforia e bem-estar, atua também como importante fator de risco (BARNES et al., 2005; CHEN et al., 2006).

O consumo crônico de álcool também é relatado como importante fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral. Embora não seja considerado capaz de causar a doença como um fator independente, sua ação é sinérgica com o tabaco, cujos efeitos carcinogênicos são então potencializados (HASHIBE et al., 2000), porque o álcool atuaria alterando a estrutura da mucosa oral, aumentando sua permeabilidade aos carcinógenos (CAMPISI et al., 2006). Comparado ao dos não-fumantes, o risco de fumantes que consomem mais que

sessenta cigarros por dia desenvolverem a doença é dezessete vezes maior e cem vezes maior quando, além de pelo menos sessenta cigarros, o indivíduo ingere mais que cinco doses de álcool por dia (NEVILLE; DAY, 2002).

O fato de que 15 a 20% dos pacientes desenvolvem essa doença sem terem sido expostos a estes agentes (GILLISON; SHAH, 2001) ou sem nenhum defeito genético óbvio predisponente sugere fortemente a possibilidade da existência de outros fatores de risco para a carcinogênese oral, como por exemplo, agentes infecciosos (SCULLY, 2002). Assim, a infecção pelo HPV, especialmente pelos tipos 16 e 18, de conhecido potencial oncogênico, é sugerida como possível fator associado ao carcinoma epidermóide oral (BARNES et al., 2005) e, apesar de vários artigos de revisão da literatura disponíveis (HA; CALIFANO, 2004; MILLER; JOHNSTONE, 2001; NAIR; PILLAI, 2005; SCULLY, 2002; SYRJÄNEN, 2003), o assunto permanece controverso. Fatores de risco como condição sócio-econômica, habitação em áreas rurais, imunodeficiência, uso de colutórios, hábitos nutricionais/ índice de massa corpórea, idade e sexo são sugeridos, porém pouco compreendidos. Presença crônica de doença periodontal, má higiene oral, estimulação galvânica, ausência dos dentes, próteses mal-adaptadas ou traumas em mucosa são sugeridos apenas como co-fatores (BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005).

O gênero mais afetado por essa doença é o masculino, na proporção de 2:1. Mas é importante salientar que esta proporção já foi de 6:1 na década de 1950, o que mostra uma tendência crescente do gênero feminino ser afetado pela doença. Isso se deve principalmente ao fato de que antigamente os hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas eram predominantemente masculinos e hoje esses hábitos estão distribuídos quase igualmente entre os gêneros. A ocorrência do carcinoma

epidermóide é classicamente observada em indivíduos mais idosos – seu diagnóstico é estabelecido geralmente entre a sexta e a sétima década de vida do paciente – mas um número alarmante de casos identificados em indivíduos mais jovens, notadamente homens em torno dos 40 anos de idade, vem sido reportado. Pacientes do gênero feminino tendem a apresentar a doença em idades mais avançadas (BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005; NEVILLE; DAY, 2002).

O carcinoma epidermóide pode ocorrer em qualquer sítio da cavidade oral – lábios, língua, gengivas, palato, assoalho e mucosa jugal – porém um estudo analisando tumores de pequenas dimensões e sem sintomas demonstrou maior freqüência em assoalho e lateral/ventre de língua, sugerindo então que estes são os sítios mais freqüentes de surgimento da lesão, independente do posterior envolvimento de outros sítios adjacentes (BARNES et al., 2005). Suas características clínicas variam muito de acordo com o estágio da doença: inicialmente pode apresentar-se como uma placa esbranquiçada, uma mácula avermelhada ou uma mistura das duas, progredindo para uma massa endurecida de crescimento endo ou exofítico, que pode apresentar ulceração indolor e sangramento (LEE et al., 2006; NEVILLE; DAY, 2002).

O prognóstico do carcinoma epidermóide oral se mantém desfavorável ao longo das últimas décadas, com taxas de sobrevida em 5 anos em torno de 50%, apesar de todas as pesquisas realizadas sobre aspectos biológicos e moleculares da doença e sobre novos métodos para seu tratamento. Um ponto-chave nessa falta de melhora do prognóstico é que uma proporção significativa dos casos não é diagnosticada ou tratada antes que a doença atinja um estágio avançado - a taxa de sobrevida em 5 anos para casos tratados em estágio inicial chega a 80% (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002). Esse atraso no diagnóstico pode ser atribuído aos

pacientes, que não procuram um serviço de saúde ao perceber o aparecimento de uma lesão, ou aos próprios profissionais de saúde, que podem não perceber pequenas lesões em exames de rotina (MEHROTRA et al., 2006). Em um recente estudo sobre o conhecimento dos dentistas brasileiros sobre câncer de boca, Leão et al. (2005) verificaram que a maioria dos entrevistados não saberia reconhecer as principais características clínicas do câncer de boca e também não teria a correta conduta frente a uma lesão suspeita.

Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos no intuito de elucidar o processo de carcinogênese oral e assim, poder estabelecer fatores preditivos e prognósticos, além de futuros tratamentos moleculares específicos para cada caso. Certas características, tais como estadiamento do tumor, disseminação extracapsular, margem da ressecção livre de doença e espessura do tumor já foram comprovados como fatores prognósticos de alta confiabilidade (MASSANO et al., 2006). Estudos recentes levaram a um modelo molecular de carcinogênese, entretanto marcadores moleculares com incontestáveis significâncias em prognóstico ainda não foram identificados (BARNES et al., 2005).

A transformação de um tecido normal em maligno é um processo em nível genético que mais tardiamente fica evidente em nível celular (mudança fenotípica) e por último é reconhecido clinicamente. Um modelo das prováveis alterações genéticas que ocorrem na transformação maligna foi proposto, baseado em análises de marcadores micro-satélites (pequenas seqüências de DNA que se repetem ao longo do genoma) para detectar perda de heterozigocidade na seqüência genética de cromossomos específicos (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002).

Em nível celular, o epitélio passa por estágios em que apresenta displasia epitelial, ou seja, estrutura atípica sugestiva de malignidade, porém sem evidência

de invasão do tecido conjuntivo subjacente. Essa displasia pode ser classificada como discreta, moderada, intensa ou carcinoma *in situ*, de acordo com a severidade da atipia e espessura do epitélio envolvida (BARNES et al., 2005).

Por fim, clinicamente o carcinoma epidermóide oral é freqüentemente precedido pela presença de alterações pré-malignas identificáveis na mucosa oral. Geralmente essas lesões se apresentam como placas brancas, vermelhas ou mistas (NEVILLE; DAY, 2002), e são chamadas então lesões potencialmente malignas. Essas lesões recebem essa denominação por terem um risco maior de transformação maligna em carcinoma epidermóide se comparadas à mucosa normal ou a outras lesões de mucosa oral. A OMS reconhece eritroplasia, leucoplasia, eritroleucoplasia, líquen plano e fibrose submucosa como as únicas integrantes desse grupo de lesões (BARNES et al., 2005).

2.2 Leucoplasia oral

A leucoplasia é uma lesão relativamente comum em mucosa oral, afetando de 0,2 a 4,9% da população em geral e pode ser definida como uma lesão predominantemente branca ao exame clínico que não pode ser diagnosticada como nenhuma outra doença da mucosa oral (LEE et al., 2006). Leucoplasia é um termo de diagnóstico clínico, provisional e de exclusão. Deve-se identificar e eliminar possíveis fatores etiológicos e, se a lesão persistir por 2 a 4 semanas, uma biópsia deve ser feita para descartar a possibilidade de se tratar de outra lesão através do

exame histopatológico – só então o diagnóstico definitivo pode ser concluído (SCHEPMAN et al., 1996).

Os aspectos histológicos da leucoplasia oral podem variar desde atrofia até hiperplasia do epitélio, com ou sem hiperqueratose. Variados graus de displasia epitelial podem ser observados em uma minoria dos casos, fato que, juntamente com estudos clínicos que observaram transformação maligna em leucoplasias, possibilitaram a classificação da leucoplasia oral como lesão potencialmente maligna (LEE, et al., 2006).

A leucoplasia oral se origina de reações inespecíficas do epitélio em resposta a vários estímulos endógenos e exógenos (CHEN et al., 2006), podendo ser associada a uma ampla gama de agentes físicos, químicos e biológicos, tais como radiação ultravioleta, álcool, fumo, má higiene oral e infecções (LEE et al., 2006). Essa lesão é mais prevalente em homens mais idosos e esta prevalência é diretamente proporcional à idade, variando desde menos de 1% na faixa dos 30 anos até 8% depois dos 70 anos de idade (NEVILLE; DAY, 2002).

Essa associação a fatores de risco semelhantes àqueles para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide oral também colaboram para provar a relação entre as duas lesões. Chen et al. (2006) verificaram que além do uso do tabaco através do fumo bem como o hábito de mascar “Paan”, como já havia sido reportado na literatura, a infecção pelo HPV tipo 18 também seria um fator de risco independente para o desenvolvimento da leucoplasia oral. Hashibe et al. (2000) observaram que o consumo de álcool pode ser um fator de risco independente e que o índice de massa corpórea, independente do uso de tabaco e/ou álcool, talvez também esteja associado ao desenvolvimento desse tipo de lesão. Thomas et al. (2003) conduziram um estudo sobre múltiplas lesões potencialmente malignas

ocorrendo simultaneamente em um paciente, de acordo com a teoria do campo de cancerização, e concluíram que a leucoplasia oral pode estar presente em concomitância com a fibrose submucosa e/ou eritroplasia e que o hábito de mascar “Paan” parece ser o principal fator para essa simultaneidade.

Apesar de seu caráter potencialmente maligno ser incontestável, o índice de transformação maligna das leucoplasias orais não pode ser definido com precisão baseado nos dados da literatura (BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005). Há estudos clínicos que indicam que 0,13 a 36,4% dessas lesões tornar-se-ão carcinomas epidermóides em um intervalo de 1 a 11 anos, mas esses estudos diferem muito na classificação dessas leucoplasias de acordo com seu aspecto clínico, sítio de ocorrência e presença de displasia epitelial, fatores que sabidamente influem no prognóstico dessas lesões (LEE et al., 2006).

Um maior potencial maligno é observado em lesões que apresentam displasia epitelial (LEE et al., 2006). Embora o grau dessa displasia tenha sua significância, seu valor prognóstico não é preciso: casos que a apresentem de forma discreta ou até que não a apresentem estão sob risco de progressão para posteriores estágios em que graus maiores de displasia serão observados e, portanto, devem ser removidas cirurgicamente e o paciente, acompanhado cuidadosamente (SILVERMAN JR.; GORSKY; KAUGARS, 1996). Além do que, a gradação das displasias é ainda altamente subjetiva, apesar de todo o esforço em se elaborar uma classificação com reprodutibilidade (BARNES et al., 2005).

Em boca, a leucoplasia afeta preferencialmente mucosa jugal, mucosa alveolar e lábio inferior, mas aquelas que afetam assoalho e lateral da língua são mais propensas a apresentarem displasia epitelial e pior prognóstico (NEVILLE; DAY, 2002).

Embora seja definida como uma lesão branca homogênea, a leucoplasia oral pode apresentar algumas variações em seu aspecto clínico, sendo classificada, em ordem de severidade, em homogênea, ulcerada, nodular e verrucosa (HASHIBE et al., 2000). A lesão pode exibir áreas avermelhadas e ulceradas, sendo então denominada eritroleucoplasia, na qual é mais provável que se observe displasia epitelial, freqüentemente moderada a intensa (BARNES et al., 2005). Um outro possível aspecto clínico relacionado ao tempo de progressão é o espessamento da lesão, com sua superfície apresentando irregularidades – trata-se do subtipo nodular (NEVILLE; DAY, 2002). Seu potencial maligno aumentado é relacionado ao tempo prolongado de seu curso clínico (LEE et al., 2006). Um subtipo bem particular é a leucoplasia verrucosa proliferativa. Apresenta-se clinicamente difusa, multifocal e com crescimento exofítico verrucoso e tem uma taxa de quase 100% de transformação maligna em carcinoma epidermóide ou carcinoma verrucoso (BATSAKIS; SUAREZ; EL-NAGGAR, 1999).

Lee et al. (2006) analisaram 1046 casos de casos diagnosticados clinicamente como leucoplasias orais e verificaram que 135 casos (12,9%) histologicamente já eram carcinomas epidermóides. Correlacionando os dados clínicos destes casos, eles concluíram que as leucoplasias de assoalho e língua e de aparência não-homogênea têm 2,72 e 28,13 vezes mais chances de apresentarem malignidade histologicamente se comparadas às de mucosa jugal e de aparência homogênea. A escolha do sítio de biópsia nessas lesões é crítica, já que os achados histológicos podem variar ao longo da lesão – os autores acreditam que possivelmente o número de casos com transformação seja ainda maior devido a esse fato. O uso do azul de toluidina, fluido que cora sítios de possível caráter

maligno, pode ser um importante acessório nesse contexto (MEHROTRA et al., 2006).

Assim, a análise das características clínicas e histológicas pode ajudar a prever o comportamento e prognóstico das lesões. Mas as características moleculares possivelmente sejam os parâmetros que mais precocemente detectariam a probabilidade da transformação do tecido, antes que alterações clínicas ou até mesmo celulares sejam notadas, além de eliminar a subjetividade de interpretação e classificação. Estudos recentes propuseram que lesões que apresentem perda de heterozigocidade no braço longo dos cromossomos 3 e 9 apresentariam maiores risco de transformação maligna em comparação aos casos sem perda genética. O risco seria ainda maior se perdas adicionais em outros cromossomos específicos fossem observadas (4q, 8p, 11q, 13q e 17p) (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002). Isso pode se aplicar não somente em lesões potencialmente malignas, mas também para verificar as margens de resecção de um tumor maligno, por exemplo.

2.3 Papilomavírus humano (HPV)

Os papilomavírus humanos constituem um grupo de vírus-DNA epiteliotrópicos associado à etiologia de diversos tumores benignos e malignos de característica geralmente papilomatosa, hiperplásica e/ou verrucosa, em pele e tratos anogenital e aerodigestivo. Existem mais de 100 tipos de HPVs sendo que

mais de 80 já foram identificados e classificados em HPVs de alto, médio ou baixo risco, de acordo com sua associação com malignidade (LAZZARI et al., 2004).

Os HPVs se apresentam como vírus icosaédricos não-encapsulados de genoma DNA circular em dupla fita de aproximadamente 8.000 pares de base (RIVERO; NUNES, 2006). Seu genoma é constituído de nove seqüências “open-reading frame”, localizadas em apenas uma das fitas de DNA, e é dividido em sete genes “early-phase” (E) e dois genes “late-phase” (L) (Figura 2.1). Os genes E servem para regular a transcrição de DNA enquanto os genes L codificam proteínas envolvidas na propagação viral, como as proteínas do capsídeo (HA; CALIFANO, 2004).

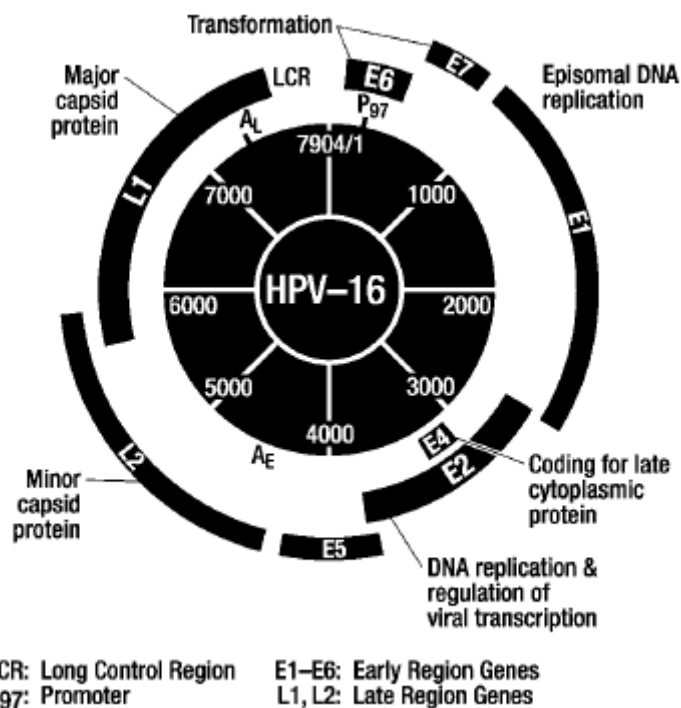


Figura 2.1 – Mapa genômico do HPV tipo 16 (HUBBARD, 2003)

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

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

A oncoproteína E6 pode se ligar e interferir no funcionamento do produto do gene supressor de tumor p53. Essa inativação da proteína p53 é fator conhecido para o desenvolvimento de neoplasias malignas em diversos sítios do corpo humano, inclusive em carcinomas epidermóides orais – a inativação do gene p53 seja por mutação ou por infecção por HPVs de alto risco é extremamente freqüente em diversas linhagens celulares de carcinoma epidermóide oral (MIN et al., 1994). Além disso, E6 produzidas por HPVs de alto risco podem ativar a enzima telomerase, que sabidamente é outro fator envolvido na carcinogênese (SCULLY, 2002).

A oncoproteína E7 pode se ligar e interferir no funcionamento do produto do gene supressor de tumor Rb1 (pRB) e proteínas relacionadas. A forma hipofosforilada de pRB forma um complexo com o fator de transcrição E2F e impede a progressão do ciclo celular de G1 para S. E7 é capaz de romper essa interação entre pRB e E2F, permitindo que E2F ative seus subseqüentes alvos celulares necessários para a progressão do ciclo celular (FREGONESI et al., 2003).

Além de E6 e E7, o gene E5 pode estar envolvido também, já que seu produto, a proteína E5, altera a resposta dos receptores tirosino-quinase nas células e pode assim modular o receptor de EGF (SCULLY, 2002), estimulando o crescimento epitelial (TINOCO et al., 2004).

Em boca, pelo menos 25 tipos de HPV já foram identificados: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72 e 73. As doenças benignas associadas a HPV em cavidade oral são: papiloma e condiloma acuminado, associado principalmente aos tipos 6 e 11; verruga vulgar, associada principalmente aos tipos 2 e 57 e hiperplasia epitelial focal, associada principalmente aos tipos 13 e 32. É importante citar que em pacientes imunossuprimidos, é comum que se encontrem múltiplos e incomuns tipos de HPV em uma única lesão (BARNES et al., 2005; PIATELLI et al., 2001; SYRJÄNEN, 2003).

O câncer cervical e suas lesões precedentes são fortemente associados à infecção por HPV, que está presente em mais de 90% dos casos, representado principalmente pelos tipos de alto risco 16 e 18. Observando as similaridades morfológicas entre a mucosa cervical e do trato aerodigestivo superior, Syrjänen et al. (1983) propuseram o HPV como fator etiológico para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (SYRJÄNEN, 2005). Inúmeros estudos foram conduzidos para sustentar essa hipótese desde então; entretanto o tópico é ainda bastante controverso na literatura. Nem mesmo em lesões malignas/malignizantes orais de aspecto clínico sugestivo, como o carcinoma verrucoso ou a leucoplasia verrucosa proliferativa, o HPV é totalmente aceito como fator etiológico – a etiopatogênese dessas lesões é ainda considerada obscura (BATSAKIS; SUAREZ; EL-NAGGAR, 1999; OLIVEIRA et al., 2006).

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

Uma entidade intitulada displasia coilocítica surgiu na década de 1980 quando se percebeu que lesões cervicais infectadas por HPV apresentavam muito freqüentemente características de displasia intra-epitelial, tais como aumento no número de figuras de mitose típicas e atípicas, disqueratose e atipia basilar (FLETCHER, 1983). Em boca, também foi proposto que se usasse esse termo para designar uma variante de displasia epitelial, que apresentasse não só as características de displasia, mas também as características indicativas de infecção por HPV. Essa distinção é importante na gradação das displasias, já que atipias celulares provocadas pela infecção viral não devem ser consideradas como critério na classificação da displasia em discreta, moderada ou intensa (FORNATORA et al., 1996).

Diversos estudos investigaram a presença do HPV em carcinomas epidermóides de boca e lesões potencialmente malignas, principalmente leucoplasias com ou sem displasia epitelial, e apresentaram resultados que vão de 0 a 100% (HA et al., 2002). Essa discrepância nos números se deve principalmente à variedade de metodologias utilizadas para a detecção do vírus, as quais apresentam diferentes níveis de sensibilidade. Existem diferentes métodos para detecção do HPV em tecidos tais como métodos diretos de sondagem (*Southern blot*, hibridização *in situ* (ISH)), de amplificação de sinal (captura híbrida) e de amplificação do alvo (reação em cadeia da polimerase (PCR)), nesta ordem de sensibilidade (HUBBARD, 2003), cada um com suas vantagens.

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

Outro fato que também pode explicar essa discrepância nos números reportados é a falta de consenso na escolha dos sítios anatômicos a serem incluídos no estudo. Carcinomas de orofaringe e tonsilas exibem índices de detecção de HPV maiores que os encontrados em média nos carcinomas de boca e laringe (BRITO; VASSALO; ALTEMANI, 2000; DAHLSTROM et al., 2003; GILLISON et al., 2000). Portanto estudos que sejam conduzidos em carcinomas de cabeça e pescoço como um todo ou que considerem orofaringe e/ou tonsilas como sítios da cavidade oral podem superestimar os índices reais relacionados ao carcinoma epidermóide oral.

Apesar de tanta variação encontrada nos estudos pesquisando a relação entre lesões malignas/malignizantes da cavidade oral e infecção por HPV, em uma recente meta-análise feita sobre esses estudos, de 1982 a 1997, Miller e Johnstone (2001) concluíram que há evidência quantitativa para a associação do desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral com a infecção pelo HPV, particularmente pelos tipos de alto risco. Os artigos de revisão mais recentes admitem a relação entre HPV e carcinogênese oral como um fato (HA; CALIFANO, 2004; SYRJÄNEN, 2005) tanto considerando o HPV um fator independente (MILLER; JOHNSTONE, 2001; SCULLY, 2002) quanto considerando o HPV como um intensificador dos efeitos do uso do tabaco e álcool (MOORE et al., 2001; NAIR; PILLAI, 2005).

A identificação e classificação do tipo de HPV encontrado é outro fator importante a ser analisado sempre que da detecção desse vírus em uma lesão. O HPV pode transformar queratinócitos de boca, especialmente na presença de carcinógenos químicos, mas apenas os tipos de alto risco são capazes de imortalizá-los. As oncoproteínas produzidas por HPVs de alto risco se ligam de maneira mais forte e eficiente a seus alvos, p53 e pRB, do que as oncoproteínas produzidas por

HPVs de baixo risco (SCULLY, 2002). Os tipos 16 e 18 são os mais freqüentemente identificados nos estudos em carcinoma epidermóide oral e suas lesões precursoras, além de outros tipos de alto risco como 31, 33, 39, 45, 52, 58 e 69 (HA; CALIFANO, 2004) e baixo risco como 6 e 11 (SYRJÄNEN, 2003), fato que também contribui para fortalecer a indicação de um papel para HPV na carcinogênese oral.

Apesar da abundância de estudos que detectem e identifiquem o HPV em carcinoma epidermóide oral e suas lesões precursoras, há carência de estudos que analisem a integração do vírus, parâmetro que parece ser crucial na carcinogênese cervical, apesar de não ser ainda um consenso na literatura. Os genomas de HPVs de alto risco se replicam na forma de moléculas episomais no ciclo viral normal. Em lesões cervicais, observa-se que esse genoma se mantém nessa forma episomal em lesões precoces de baixo grau de displasia, mas o genoma viral inteiro ou parte dele é integrado covalentemente no DNA cromossômico da célula hospedeira em lesões precancerosas avançadas e nos carcinomas. Essa observação sugere fortemente que a integração de genes virais aumenta dramaticamente a progressão neoplásica para um carcinoma invasivo (WENTZENSEN; VINOKUROVA; VON KNEBEL-DOEBERITZ, 2004). A integração de seqüências genômicas virais pode causar deleção do gene E2 e resultar na perda de sua função de regulação da expressão viral. Esse evento é geralmente seguido por um aumento na transcrição dos genes E6 e E7, aumentando a produção das oncoproteínas virais (HUDELIST et al., 2004). Os poucos estudos que analisaram esse parâmetro em lesões de boca, encontraram ambos os estados de integração e não conseguiram conclusões satisfatórias (SCULLY, 2002).

Como citado anteriormente, existem ainda outros parâmetros que podem auxiliar na determinação da relação causal entre a infecção pelo HPV e o

desenvolvimento da lesão. É provável que exista uma relação direta entre o número de cópias de um HPV em uma célula ou em um sítio anatômico e o risco de desenvolvimento de uma lesão associada ao HPV. Essa idéia é baseada na experiência com testes laboratoriais envolvendo outras infecções virais, como a infecção pelo HIV ou pelo vírus da hepatite C, nas quais a determinação da carga viral é importante (HUBBARD, 2003). Swan et al. (1999) verificaram que, em lesões cervicais, a carga viral é diretamente proporcional ao grau de malignidade da lesão.

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

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

A literatura ainda sugere que os carcinomas epidermóides orais associados ao HPV são entidades de evolução e prognóstico distintos e devem ter protocolos de

tratamento diferenciados (SHILLITOE, 2006). Estudos correlacionam a presença do HPV, mesmo sendo tipos de alto risco, a um melhor prognóstico (GILLISON et al., 2000, SUGIYAMA et al., 2006), porém sua correlação com a gradação histológica bem como estadiamento do tumor não é significativa (CAMPISI et al., 2006). Massano et al. (2006) em um artigo de revisão verificaram que não há um total consenso quanto ao valor prognóstico do HPV nos trabalhos analisados.

Lo Muzio et al. (2005) confirma essa sugestão da literatura através da obtenção de um padrão imunoistoquímico de marcadores do ciclo celular diferente para casos de carcinomas epidermóides orais associados ao HPV. Os autores observaram que os tumores HPV-positivos apresentaram menor expressão de marcadores de proliferação celular e também menor expressão de marcador de apoptose, comparando-se à expressão observada em tumores HPV-negativos.

Outros trabalhos também correlacionam marcadores imunoistoquímicos à presença de HPV. A survivina é uma proteína da família IAP e, portanto, inibe a apoptose. Os dados encontrados no estudo de Lo Muzio et al. (2004) mostraram que a correlação da expressão da survivina e infecção por HPV foi observada em padrões invertidos em carcinomas epidermóides orais e leucoplasias orais: a expressão de survivina foi mais vista em carcinomas HPV-negativos enquanto as leucoplasias orais HPV-positivas expressaram mais a proteína em questão. Esses resultados sugerem que a survivina pode estar envolvida na desregulação mediada pelo HPV durante a maturação do epitélio escamoso através da modulação dos processos de apoptose e, da mesma maneira, o HPV pode ter um efeito direto ou indireto na regulação do nível de expressão da survivina.

p16 parece ser um marcador confiável de infecção por HPV em lesões malignas/malignizantes da mucosa oral. p16 é uma proteína supressora de tumor,

produto do gene CDKN2, que se liga à CDK4 ou 6, que por sua vez não consegue formar complexo com as ciclinas, responsável pela fosforilação da pRB, o que a mantém ativa, impedindo a progressão do ciclo celular (FREGONESI et al., 2003). Estudos mostram que há uma forte associação entre a superexpressão imunohistoquímica da proteína p16 e infecção por HPVs de alto risco em carcinomas epidermóides orais e suas lesões precedentes. Esses estudos sugerem então a detecção da proteína p16 como um método confiável e simples para a identificação de lesões malignas/malignizantes de cavidade oral relacionadas ou induzidas por HPVs de alto risco (CUNNINGHAM et al., 2006; FREGONESI et al., 2003).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença do HPV em leucoplasias orais com variados graus de displasia epitelial e em carcinomas epidermóides orais, especificando os subtipos encontrados nos casos positivos quando possível, além de analisar a possível correlação da presença do HPV com o grau de malignidade ou características clínicas das lesões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística e análise morfológica

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme parecer de aprovação número 33/06 (Anexo A).

Casos diagnosticados como leucoplasia e carcinoma epidermóide foram selecionados dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Cortes corados por hematoxilina e eosina referentes a esses casos foram submetidos a um novo estudo morfológico sob microscopia de luz para confirmação do diagnóstico e reclassificação dos graus de displasia, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS em 2005 (Tabela 4.1). Dados referentes à idade e sexo dos pacientes bem como sítio da lesão foram observados e pacientes que apresentavam lesões em orofaringe foram excluídos.

Os 50 casos então foram simetricamente divididos em 5 grupos, que atendiam, pelo menos, os seguintes quesitos:

- Grupo 1: hipótese de diagnóstico clínico: leucoplasia
diagnóstico histológico: para ou ortoqueratose
ausência de displasia epitelial
- Grupo 2: hipótese de diagnóstico clínico: leucoplasia
diagnóstico histológico: para ou ortoqueratose
presença de displasia epitelial discreta

- Grupo 3: hipótese de diagnóstico clínico: leucoplasia
diagnóstico histológico: para ou ortoqueratose
presença de displasia epitelial moderada
- Grupo 4: hipótese de diagnóstico clínico: leucoplasia
diagnóstico histológico: para ou ortoqueratose
presença de displasia epitelial intensa
- Grupo 5: diagnóstico histológico: carcinoma epidermóide

Tabela 4.1 – Critérios estabelecidos pela OMS para diagnóstico e classificação de displasia epitelial

DISPLASIA		
pelo menos um distúrbio arquitetural e um distúrbio celular		
DISCRETA	MODERADA	INTENSA
distúrbios restritos ao terço inferior do epitélio	distúrbios restritos ao dois terços inferiores do epitélio	distúrbios encontrados nos três terços do epitélio
DISTÚRBIOS		
ARQUITETURAIS	CELULARES	
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose	
Inversão da polaridade de células basais	Pleomorfismo nuclear	
Projeções epiteliais em gota	Anisocitose	
Número aumentado de figuras de mitose	Pleomorfismo celular	
Mitoses superficiais	Aumento da proporção núcleo-citoplasma	
Disqueratose	Mitoses atípicas	
Pérolas de queratina	Núcleos hiper cromáticos	
	Aumento em número/tamanho dos nucléolos	

Fonte: Barnes et al. (2005)

4.2 Técnica de hibridização *in situ*

A partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, previamente fixado em formol 10% e embocado em parafina, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e silanizadas. Após secagem durante 24 horas em estufa a 60°C, os cortes foram submetidos à desparafinização em dois banhos de xilol, um a 60°C por 15 minutos, e outro em temperatura ambiente por mais 15 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em série descendente de etanóis, através de duas passagens de 1 minuto cada em etanol absoluto e uma passagem de 3 minutos em etanol 95%. Posteriormente, foram lavados em banho de água destilada durante 6 minutos.

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

Os cortes foram então lavados novamente em água destilada, secos e encubados com a sonda biotinilada de amplo espectro para DNA de HPV. Os cortes foram cobertos com lamínulas de vidro, para permitir íntimo contato entre a sonda e o tecido, e as lâminas foram colocadas sobre uma placa com temperatura de 95°C

durante 5 minutos, para denaturação protéica do DNA da sonda e do DNA-alvo no tecido. As lâminas ficaram em câmara úmida por 21 horas à temperatura de 37°C para a hibridização.

No segundo dia, os cortes foram lavados com tampão TRIS-NaCl, pH7,4 e a detecção da hibridização procedeu-se utilizando o sistema catalisado de amplificação de sinal para hibridização *in situ* (CSA-ISH) GenPoint™ (DakoCytomation, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

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

Nos casos positivos, a reação foi repetida substituindo-se a sonda de amplo espectro por sondas específicas para os tipos 6/11, 16/18 e 31/33 (DakoCytomation, USA).

Como controle negativo não foi realizada a incubação com o anticorpo primário fornecido pelo sistema GenPoint™ e como controles positivos foram utilizados casos de infecção por HPV em mucosa oral previamente testados e positivos para as sondas e método em questão.

4.3 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita mediante uma avaliação qualitativa da presença de células positivas para HPV em microscopia de luz por dois observadores. Foram consideradas positivas as células epiteliais que apresentaram sinal de hibridização, representado por pequenos pontos acastanhados e/ou coloração acastanhada difusa no núcleo celular. A intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas não foram levadas em consideração. A análise estatística dos dados foi realizada através do teste exato de Fischer e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

Quanto à idade dos pacientes, observamos que houve predileção pelas 4^a, 5^a e 6^a décadas de vida, sendo que a mediana de idade foi de 52 anos (alcança 06 a 85, desvio padrão 15,93). Quanto ao sexo, observamos uma predileção muito discreta pelo sexo masculino, na proporção de 1,1:1, sem significância estatística. O sítio mais afetado foi língua, seguido por mucosa labial, assoalho, rebordo alveolar, mucosa jugal, palato mole e palato duro. Os resultados referentes a idade, sexo e sítio afetado estão resumidos respectivamente nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3.

Tabela 5.1 – Dados referentes à idade dos pacientes incluídos no estudo

Faixa etária (em anos)	Grupo 1 n=10	Grupo 2 n=10	Grupo 3 n=10	Grupo 4 n=10	Grupo 5 n=10	Total n=50
< 40	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)	0	0	6 (12%)
40 a 49	3 (30%)	5 (50%)	2 (20%)	2 (20%)	1 (10%)	13 (26%)
50 a 59	2 (20%)	0	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)	12 (24%)
60 a 69	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	1 (10%)	1 (10%)	11 (22%)
70 a 79	0	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	5 (10%)
> 80	0	0	0	2 (20%)	1 (10%)	3 (6%)

Tabela 5.2 – Dados referentes ao sexo dos pacientes incluídos no estudo

Sexo	Grupo 1 n=10	Grupo 2 n=10	Grupo 3 n=10	Grupo 4 n=10	Grupo 5 n=10	Total n=50
Masculino	7 (70%)	3 (30%)	3 (30%)	7 (70%)	7 (70%)	27 (54%)
Feminino	3 (30%)	7 (70%)	7 (70%)	3 (30%)	3 (30%)	23 (46%)

Tabela 5.3 – Sítios afetados pelas lesões analisadas

Sítio anatômico	Grupo 1 n=10	Grupo 2 n=10	Grupo 3 n=10	Grupo 4 n=10	Grupo 5 n=10	Total n=50
língua	2 (20%)	1 (10%)	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)	13 (26%)
mucosa labial	2 (20%)	3 (30%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	10 (20%)
assoalho	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	3 (30%)	8 (16%)
rebordo	3 (30%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	0	7 (14%)
mucosa jugal	2 (20%)	1 (10%)	0	3 (30%)	0	6 (12%)
palato mole	0	1 (10%)	1 (10%)	0	2 (20%)	4 (8%)
palato duro	0	2 (20%)	0	0	0	2 (4%)

5.2 Positividade para a sonda HPV de amplo espectro

Doze (24%) dos cinquenta casos analisados apresentaram sinal de hibridização para a sonda HPV de amplo espectro, em diferentes intensidades e em variados números de células. Nos grupos 1 a 4, as células positivas foram observadas predominantemente em camadas superficiais do epitélio, mas casos isolados apresentaram células da camada espinhosa positivas (Figura 5.1 – B, D e F).

As porcentagens de casos positivos nos grupos 1 a 5 foram respectivamente 20%, 40%, 10%, 20% e 30%, não havendo portanto correlação entre o grau de malignidade das lesões e a detecção do HPV. Se agruparmos os grupos 2, 3 e 4, que apresentam como característica displasia epitelial, apesar de a positividade para a sonda HPV de amplo espectro ter sido crescente conforme o grau de malignidade da lesão (20% em leucoplasias sem displasia, 26,7% em leucoplasias com displasia e 30% em carcinomas epidermóides), a diferença entre esses índices não é estatisticamente significativa.

Analisando-se os dados clínicos dos casos positivos para a sonda HPV de amplo espectro, verificamos que houve uma discreta predileção pelo sexo masculino, porém insignificante estatisticamente e uma significativa predileção pelas 4ª e 5ª décadas de vida. Não houve predileção por nenhum sítio anatômico em especial.

5.3 Positividade para as sondas HPV específicas

Dentre os doze casos positivos para a sonda HPV de amplo espectro, 6 (50%) apresentaram positividade para a sonda HPV 16/18, 2 (16,6%) para a sonda HPV 6/11 e apenas 1 para a sonda HPV 31/33. Dois casos não apresentaram sinal de hibridização para nenhuma das sondas específicas e 1 caso apresentou positividade para duas sondas (16/18 e 31/33). A distribuição desses resultados entre os grupos pode ser visualizada na figura 5.2.

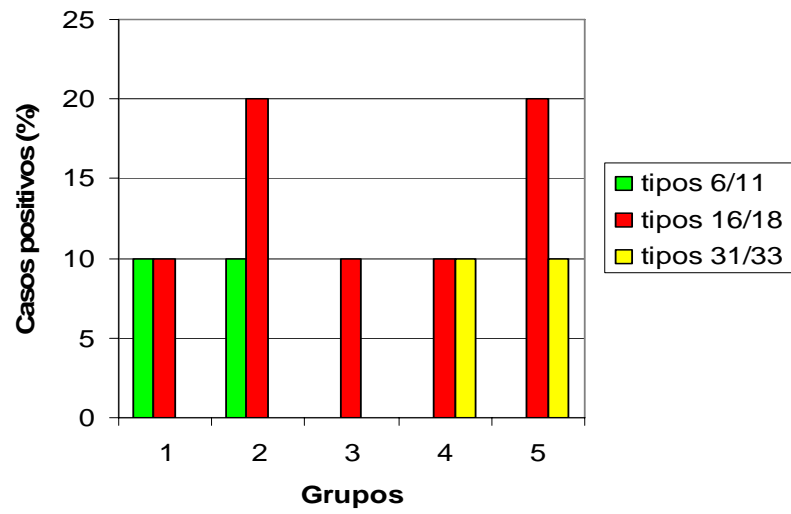


Figura 5.2 – Gráfico mostrando a distribuição dos casos positivos para as sondas HPV específicas entre os grupos analisados

6 DISCUSSÃO

É ainda bastante controverso na literatura se o HPV pode ou não ser considerado fator etiológico ou de risco para o desenvolvimento de lesões malignas/malignizantes em boca. Apesar de os índices de infecção por HPV em mucosa normal, lesões potencialmente malignas e carcinomas epidermóides orais variarem muito e nem sempre apresentarem proporcionalidade, já há um consenso de que existe evidência ao menos numérica da relação entre HPV e carcinogênese oral.

Nos casos estudados, a prevalência de infecção por HPV foi de 24%, notadamente maior que a reportada em mucosa normal – estudos recentes com grande casuística e método bastante sensível mostraram prevalência de HPV em mucosa normal entre 1 e 2% (HA; CALIFANO, 2004). Foi observada uma proporcionalidade muito discreta entre o grupo de lesões sem displasia, com displasia e carcinoma, porém estatisticamente insignificante. Desmembrando-se o grupo das lesões com displasia, torna-se mais evidente que não há relação de proporção entre o índice de infecção por HPV e grau de malignidade da lesão.

Sugiyama et al. (2003) ao detectar a presença de HPV, também não observaram proporcionalidade entre os índices encontrados em displasia epitelial discreta, moderada e intensa. Ostwald et al. (2003) entretanto sugeriram tal proporcionalidade não pelo grau de displasia das lesões, mas sim pelo seu risco de transformação maligna: analisaram líquen plano, que tem pequeno risco de transformação, leucoplasia e queilite actínica, de maior risco de transformação e

carcinoma epidermóide, encontrando HPV de alto risco em 9,2%, 16,7% e 34,7% dos casos respectivamente.

Em nossos casos, não houve correlação significativa entre nenhuma característica clínica da lesão e infecção por HPV, tanto se analisando a sonda de amplo espectro quanto as sondas específicas. Isto está de acordo com os achados de um estudo prévio que concluiu que não era possível prever a infecção por HPV apenas considerando-se as características clínicas de lesões potencialmente malignas (CAMPISI et al., 2004).

Além da detecção do vírus, sua identificação por genotipagem é também crucial ao tentar se estabelecer a relação entre HPV e carcinogênese oral. Como já citado, os diferentes tipos de HPV têm diferentes potenciais oncogênicos. Em nossos casos, os tipos 6 e 11, que são de baixo potencial oncogênico, foram identificados apenas nos grupos 1 e 2, de menor grau de malignidade. Analisando-se a totalidade dos casos positivos, os tipos 16 e 18, de alto potencial oncogênico, foram os mais prevalentes. Esses dois achados sugerem que há alguma relação entre lesões malignas/malignizantes da cavidade oral e identificação de HPVs de alto risco, indicando estes como, pelo menos, co-fatores na carcinogênese oral. Esses resultados estão de acordo com os achados do estudo de Fregonesi et al. (2003), os quais mostram notadamente maior prevalência dos tipos 16 e 18 em carcinomas epidermóides orais e suas lesões precursoras, enquanto em lesões benignas associadas ao HPV (papilomas), os autores encontraram maior prevalência dos tipos 6 e 11.

Apenas um de nossos casos, pertencente ao grupo representado por carcinomas epidermóides orais, apresentou-se positivo concomitantemente para duas sondas específicas, 16/18 e 31/33. A infecção com múltiplos tipos de HPV em

uma mesma lesão parece estar associada com um maior risco de desenvolvimento de displasia intra-epitelial em lesões cervicais. Contudo, não se sabe ao certo se certos tipos de HPV favorecem ou desfavorecem a infecção por outros tipos de HPV nem se uma superinfecção com variados tipos de HPV pode potencializar a transformação maligna (HUBBARD, 2003).

Alguns autores consideram inútil a realização da genotipagem, pelo menos em lesões cervicais, onde a maioria é infectada por mais de um tipo de HPV e também porque a transformação maligna não pode ser atribuída ao vírus somente – fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados ao hospedeiro, possíveis mutações em genes supressores de tumor e outros fatores de risco devem ser analisados em conjunto (HUBBARD, 2003). Entretanto não seria correto ignorar o fato de que os diferentes tipos de HPV exercem efeitos muito diferentes nas células, principalmente com relação ao comportamento das oncoproteínas produzidas por HPVs de diferentes riscos de malignidade. Estudos em cultura celular de queratinócitos mostram que apenas os HPVs de alto risco têm o poder de imortalização das células, conhecida característica de células em transformação maligna (PARK et al., 1991). Além disso, as oncoproteínas virais produzidas por HPVs de alto risco se ligam mais eficientemente a seus alvos: E6 produzida por HPVs de baixo risco nem chegam a formar complexos com p53 (WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990) e E7 produzida por tipos de baixo risco se ligam muito fracamente à pRB (MUNGER et al., 1989). Assim, acreditamos na validade dos resultados da genotipagem no presente estudo para tentar relacionar HPV e carcinogênese oral.

Há uma grande variedade de métodos utilizados nos estudos para a detecção do HPV em lesões de boca ou de outro sítio anatômico e a isso se deve a grande variedade de resultados reportados na literatura. A maioria dos estudos utiliza

técnicas de PCR, combinada ou não a outras técnicas, para detectar DNA de HPV em tecidos com diferentes formas de conservação e armazenamento. A razão para tal é que a técnica de PCR é o método mais sensível entre os disponíveis para a identificação do HPV, sendo, em teoria, mais confiável e com menor risco de resultados falso-negativos. Entretanto vários estudos que utilizaram PCR para pesquisar HPV em carcinomas epidermóides orais encontraram prevalências muito baixas. Rivero e Nunes (2006) analisaram 40 casos de carcinoma epidermóide oral para a presença de DNA de HPV pela técnica de PCR e em nenhum caso observaram amplificação, sendo que controles internos estritos foram devidamente incorporados no estudo e amplificaram conforme esperado. Boy et al. (2006) usando a técnica RT-PCR, encontrou apenas 7 casos positivos para DNA de HPV do tipo 18 em 59 casos de ressecções de carcinomas epidermóides orais primários. Os autores de ambos os trabalhos apontam então que o HPV não desempenha função na carcinogênese oral, reforçando a hipótese que a eventual presença de DNA de HPV pode ser apenas resultado de uma colonização incidental e secundária do vírus naquele sítio.

A determinação da técnica da PCR como “gold standard” para detecção de HPV é indiscutível e muito bem fundamentada na literatura (BOY et al., 2006; DABIC et al., 2004; HA; CALIFANO, 2004; HUBBARD, 2003; NUOVO, 2006). Mas a técnica, como todas as outras, apresenta algumas limitações. Uma delas é a quantidade de tecido necessária para a extração de DNA a ser usado na reação em si. Em nosso serviço, trabalhamos com material arquivado restante de biópsia em blocos parafinados e o material que recebemos de lesões malignas/malignizantes de mucosa oral geralmente é proveniente de biópsias incisionais. Tudo isso em conjunto resulta muitas vezes em material pobre para a realização da PCR, seja pelo

tamanho do material recebido da biópsia incisional, seja porque o bloco parafinado do arquivo já tenha sido usado para outra pesquisa no departamento. Esta pode ser a razão pela qual alguns estudos, mesmo usando essa técnica muito sensível, encontram prevalências próximas ou iguais a zero na pesquisa de HPV em lesões malignas/malignizantes de cavidade oral. Uma outra limitação da técnica da PCR é a impossibilidade de se verificar qual a relação do vírus com as células infectadas, tanto para se determinar o quanto o vírus está danificando a célula como para se identificar a posição das células infectadas no epitélio – esses parâmetros contribuem para a determinação de relação causal entre infecção pelo HPV e doença (CAMPISI et al., 2006).

A técnica de ISH é uma boa alternativa para quando as limitações da PCR se apresentam, já que é possível realizar a reação com apenas uma secção tecidual e com preservação da morfologia do tecido. Entretanto, a técnica de ISH convencional apresenta pouca sensibilidade, pois detecta somente a partir de 10 a 50 cópias do vírus por célula. Isso é particularmente insatisfatório para a pesquisa de HPV em carcinogênese já que grande parte dos cânceres cervicais apresenta menos de 50 cópias virais por célula e em lesões malignas/malignizantes de boca, quando o HPV está presente, está geralmente em baixo número de cópias (DABIC et al., 2004). Assim, estratégias para melhorar o nível de detecção por ISH vêm sendo desenvolvidas e hoje já existem sistemas de amplificação disponíveis comercialmente que realmente melhoram a detecção de DNA viral em ISH, conservando a possibilidade de se localizar morfologicamente o genoma viral no tecido analisado.

Em nosso estudo optamos então por usar o método CSA-ISH, que é um sistema baseado na amplificação catalisada de sinais positivos de hibridização

através de complexos biotínil-tiramida. Esse sistema se mostrou sensível suficiente para detectar uma ou duas cópias de DNA de HPV, tendo supostamente sensibilidade comparável à técnica da PCR (DABIC et al., 2004; FREGONESI et al., 2003). Existem estudos que encontram significativamente melhores resultados com PCR do que com CSA-ISH em tecidos emblocados em parafina tanto em lesões cervicais quanto em lesões de boca (BOY et al., 2006; DABIC et al., 2004), mas o grau de concordância entre os métodos na literatura é muito variável. Esse método é difícil de ser otimizado e interpretado, já que freqüentemente nessa reação há presença de marcação de fundo, o que dificulta a diferenciação entre marcação inespecífica e marcação pontual positiva para HPV, descrita como sinais discretos no núcleo (BOY et al., 2006; EVANS; ALIESKY; COOPER, 2003). Apesar disso, todos os estudos concordam que o CSA-ISH é um método confiável e melhor que ISH convencional na detecção de DNA de HPV em conjunto com a análise morfológica do tecido, ainda que o ideal seja que esse método fosse utilizado em conjunto com alguma técnica de PCR.

O método CSA-ISH pode ainda supostamente indicar o estado de integração viral de acordo com seu padrão de marcação (COOPER et al., 1991). Comparando com os exemplos de marcação de HPV episomal e integrado utilizados por Dabic et al. (2004), nossos casos apresentaram predominantemente o estado episomal de integração, o que está de acordo com o comentário de Ha e Califano (2004) em um artigo de revisão que sugere que o HPV em cavidade oral provavelmente só reside na forma episomal e não necessariamente se integra ao genoma da célula hospedeira, o que não significa que assim o vírus não tenha potencial oncogênico. Preferimos não explorar esse achado já que o CSA-ISH só sugere o estado de

integração viral – o estado exato de integração só pode ser determinado por outros métodos moleculares mais complexos.

Nossos resultados sugerem que a detecção do HPV não está relacionada com o grau de malignidade das lesões, haja visto a ausência de proporcionalidade entre os índices de detecção do vírus nos grupos analisados. Entretanto, o fato de que a prevalência em nossa casuística, constituída por lesões malignas/malignizantes, foi maior do que àquela encontrada em mucosa normal e que os tipos de alto risco foram os mais prevalentes dentre os casos positivos não nos permite descartar o HPV como fator de risco para a carcinogênese oral. Estudos futuros com maior casuística, que utilizem diferentes métodos de detecção concomitantemente, que analisem outros fatores relativos à infecção viral e que a correlacionem com outros marcadores biológicos são necessários para elucidar o papel do HPV na carcinogênese oral.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 O índice de detecção do HPV foi maior nos casos do estudo do que os índices reportados em mucosa oral normal, o que sugere que o HPV tenha alguma relação com as lesões estudadas.
- 7.2 Não foi observada proporcionalidade entre os índices de detecção do HPV e os diferentes graus de malignidade analisados, sugerindo que não há relação entre essas duas variáveis.
- 7.3 Os tipos de alto risco foram os mais prevalentes em todos os grupos do estudo e a identificação dos tipos de baixo risco foi exclusivamente observada nos grupos de menor grau de malignidade, o que pode indicar a relação entre HPV e carcinogênese oral.

REFERÊNCIAS¹

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lion: IARC Press;2005.

Batsakis JG, Suarez P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. Oral Oncol 1999;35(4):354-9.

Boy S, van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological or contamination? J Oral Pathol Med 2006;35(2):86-90.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA;2005.

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

Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a comprehensive review for oral healthcare providers. J Contemp Dent Pract 2005;6(4):1-16.

Campisi G, Giovannelli L, Aricò P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leucoplakia and lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98(6):705-11.

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

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. Head Neck 2004;26(1):31-8.

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

Chen PC, Pan C, Kuo C, Lin C. Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(1):57-61.

Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JO. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic *in situ* hybridisation. *J Clin Pathol* 1991;44(12):990-6.

Cunningham LL Jr, Pagano GM, Li M, Tandon R, Holm SW, White DK, et al. Overexpression of p16INK4A is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):77-81.

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

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

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

Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based *in situ* hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol* 2003;3(1):2.

Fletcher S. Histopathology of papilloma virus infection of the cervix uteri: the history, taxonomy, nomenclature, and reporting of koilocytic dysplasias. *J Clin Pathol* 1983;36(6): 616-24.

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

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

Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13(3):183-8.

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

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

Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1203-9.

Hashibe M, Sankaranarayanan R, Thomas G, Kuruvilla B, Mathew B, Somanathan T, et al. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leucoplakia in an Indian population. *Int J Cancer* 2000;88(1):129-34.

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

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

Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004;92(3):873-80.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56(2):106-30.

Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res* 2003;544(2-3):305-11.

Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956;63(6):1245-61.

Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004;33(5):260-3.

Leão JC, Góes P, Sobrinho CB, Porter S. Knowledge and clinical expertise regarding oral cancer among Brazilian dentists. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(4):436-9.

Lee J, Hung H, Cheng S, Chen Y, Chiang C, Liu B, et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(4):472-80.

Lo Muzio L, Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Greco I, Staibano S, et al. HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship? *Oral Oncol* 2004;40(7):736-41.

Lo Muzio L, D'Angelo M, Procaccini M, Bambini F, Calvino F, Florena AM, et al. Expression of cell cycle markers and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: use of fuzzy neural networks. *Int J Cancer* 2005;115(5):717-23.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):67-76.

Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006;5:11.

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

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

Moore TO, Moore AY, Carrasco D, van der Straten M, Arany I, Au W, et al. Human papillomavirus, smoking, and cancer. *J Cutan Med Surg* 2001;5(4):323-8.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 1989;8(13):4099-105.

Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005;11(6):350-9.

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

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

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

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

Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991;12(9):1627-31.

Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi T. Warty carcinoma of the oral mucosa in an HIV+ patient. *Oral Oncol* 2001;37(8):665-7.

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

Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(6):416-9.

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

Shillitoe EJ. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2006;13(5):445-50.

Silverman S Jr, Gorsky M, Kaugars GE. Leucoplakia, dysplasia, and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(2):117.

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

Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Higashikawa K, et al. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2006. No prelo.

Syrjänen S. Human papillomavirus infections and oral tumours. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003;192(3):123-8.

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32(suppl1):S59-66.

Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):1030-4.

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

Thomas G, Hashibe M, Jacob BJ, Ramadas K, Mathew B, Sankaranarayanan R, et al. Risk for multiple oral premalignant lesions. *Int J Cancer* 2003;107(2):285-91.

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

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248(4951):76-9.

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 33/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Correlação da presença do papiloma vírus humano (HPV) com diferentes graus de atipia epitelial em leucoplasias e carcinomas epidermóides de boca", de responsabilidade da Pesquisadora **Renata Rodrigues Acay**, sob orientação da Professora Doutora **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**.

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

São Paulo, 04 de abril de 2006

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP