

**JÉSSICA BOSCARIOL DA SILVA**

**Prevalência de HPV em tonsila de indivíduos sem câncer**

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

**São Paulo**

**2019**

**JÉSSICA BOSCARIOL DA SILVA**

**Prevalência de HPV em tonsila de indivíduos sem câncer**

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

**São Paulo**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Jéssica Boscariol da  
Prevalência de HPV em tonsila de indivíduos sem  
câncer / Jéssica Boscariol da Silva. -- São Paulo,  
2019.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Papillomaviridae 2.Papilomavirus  
humano 3.Orofaringe 4.Tonsila palatina  
5.Prevalência 6.Reação em cadeia da polimerase  
7.Livre de câncer

USP/FM/DBD-449/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico aos meus pais, Vilma e Adelcio, que com tanto amor sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão Danillo, exemplo de pessoa que sempre se manteve ao meu lado em todos os momentos.

Vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus e Nossa Senhora pela sabedoria e paciência concedida nos momentos de dificuldade e desânimo.

Ao Dr José Eduardo Levi, por me confiar este projeto, por todos os momentos de aprendizado, um exemplo de pesquisador. Minha sincera gratidão por todos esses anos de convivência, obrigada pela oportunidade Dudi!

À Dra. Raquel Ajub Moyses, responsável pelo meu começo na USP, por sempre me incentivar e acreditar em meu trabalho, por sempre de uma forma tão carinhosa me ensinar sobre a vida e sobre ser resiliente aos problemas. Jamais esqueci de seus ensinamentos!

Ao grupo GENCAPO, meu primeiro contato com o mundo de pesquisa, agradeço a todos sem exceção, foi uma honra participar de um projeto tão importante.

Aos meus pais, Vilma e Adalcio por toda educação que me foi passada, por todo amor, apoio e proteção e ao meu irmão Danillo, uma pessoa generosa e exemplo de coragem. Amo vocês, obrigada por me ajudarem a chegar aqui!

Ao Luiz Henrique Alves Guerra, meu namorado, companheiro e amigo, obrigada por compartilhar tantos momentos especiais. Te amo!

À minha Tia Alerte, pessoa que me faz tanta falta depois que mudou, obrigada por sempre me demonstrar carinho e preocupação.

À toda minha família, avó, tios, tias e primos, sou muito feliz por fazer parte da família Boscarol e Silva.

Aos meus amigos que são minha família, agradeço aos “Amigos do José” que marcaram minha vida para sempre, me ensinaram o quão bom é ter amizades para todos os momentos. Valdenice, Danielson, Daniele, Emerson, Daniela, Claudinho, Ademazinho e Renan *in memoriam*. Anos vão passar, a rotina vai nos distanciar, a vida tomará outros

caminhos, mas jamais deixarei de amá-los e sentir falta todos os dias, mas com toda certeza será saudades com alegria de ter dividido bons momentos ao lado de vocês.

À Aline de Oliveira, que me recebeu no LIM 28, que ensinou tanto e nunca se esqueceu de mim, agradeço todas as oportunidades que você me concedeu, jamais esquecerei e serei eternamente grata!

À Pâmela, que me auxiliou em momentos difíceis na pós-graduação e na vida, agradeço pela amizade e o respeito que construímos durante esses anos, você é um exemplo de perseverança e otimismo.

Ao Ricardo, uma pessoa excepcional, a qual tive a honra de conhecer, uma pessoa com o coração mais lindo e de uma generosidade absurda. Obrigada por me ensinar, acompanhar e acalmar quando a PCR não dava certo e obrigada por todos os momentos de apoio e descontração.

Ao LIM28 e ao HC, pela oportunidade de ingressar na USP, por todos os aprendizados e momentos especiais, agradeço a convivência de todos esses anos: Mônica, Cristiane, Cátia, Katia, Erika, Gabriela, Marina, Cleusinha, Mauricio e Dona Palmira.

À Bruna Jordão, pela convivência e pela ajuda nas coletas de amostras no Hospital Paulista.

À Fernanda, por todos os momentos no LIM e por sua amizade.

À Ariane de Freitas, amizade que ganhei e que tenho tanto carinho, um exemplo de pessoa determinada, que sabe como irá fazer diferença, fiel aos seus objetivos, tão forte e tão doce ao mesmo tempo.

Ao Biobanco (ICESP), por me receber tão bem durante o término do projeto GENCAPO e durante a extração de DNA das amostras de orofaringe, em especial, Dra Myuki, Maria José, Liliane, Denise, Diogo, Helena e Anne.

Ao Instituto de Medicina Tropical que me acolheu, agradeço todos os momentos compartilhados nas salas, nos laboratórios, nos corredores e na copa, jamais esquecerei de vocês: Marli, Anderson, Dona Sônia, Tânia Regina, Wilton, Silvinha, Luciano, Débora, Georgina, Fábio, Camila Romano, Clara Felix e Cris Fink *in memoriam*.

À Ana Carolina Soares, Luiz Nali, Paulo Urbano, Cibeli Leal, Lucas Soares, Giovana Caleiro, Cristina Freitas, Nathália Santiago e Camila Cruz por todo auxílio prestado durante os anos de pós-graduação e por todos os momentos de descontração.

À Luciana Reis Rosa Sacoman, por todos os ensinamentos transmitidos durante esses anos e por me auxiliar no desenvolvimento desta pesquisa.

À Banca Qualificação, Dr Leandro Matos, Dr Paulo Braz e Dr Camila Pegoraro, pelas orientações valiosas que enriqueceram a dissertação final.

Ao Dr Leandro Luongo Matos, pela parceria nas análises de validação da metodologia e por todos os momentos descontração!

Ao Dr Ronaldo Frizzarini e toda equipe do serviço de Otorrinolaringologia do HC pela adesão a pesquisa e pelo apoio nas coletas das tonsilas.

Ao Hospital Paulista, em especial a enfermeira Elisangela Souza e ao Dr Alexandre Minoru Enoki por adequarem toda rotina do centro cirúrgico, facilitando as coletas das tonsilas e por me receberem tão bem.

À Roseli, por sempre estar disposta ajudar e sanar as dúvidas ao longo desses anos, seu trabalho é de extrema importância, muito obrigada.

À Capes, pela bolsa de Mestrado concedida, o que tornou possível a realização deste trabalho.

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pesamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.*

Paulo Bleki



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 *dissertação, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro de 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 SIGLA E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 Papilomavírus humano.....	20
2.2 Taxonomia .....	20
2.3 Biologia do HPV.....	22
2.4 Ciclo biológico do HPV.....	24
2.5 HPV e câncer – carcinogênese .....	26
2.6 HPV e neoplasias de cabeça e pescoço .....	27
2.6.1 Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço .....	27
2.6.2 Biologia molecular do CECP .....	30
2.6.3 Tonsila – anatomia, imunologia e HPV .....	31
2.7 Rastreamento de HPV em tonsilas .....	34
2.8 Métodos moleculares para detecção de HPV .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Objetivos específicos .....	40
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Modelo do estudo .....	41
5.2 Cálculo da amostra .....	41
5.3 Casuística .....	42
5.4 Extração de DNA .....	43
5.5 PCR para gene constitutivo beta-globina .....	43
5.6 Detecção do HPV por PCR convencional .....	44
5.7 PCR em tempo real para HPV16 .....	44
5.8 Determinação da sensibilidade analítica .....	45
5.9 Análise de inibidores da PCR .....	45
5.10 Avaliação da metodologia utilizada .....	46
5.11 Análise estatística de dados clínicos e epidemiológicos .....	46

<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
6.1 Casuística .....	47
6.2 Tecido a fresco e PCR convencional .....	49
6.3 Sensibilidade analítica .....	49
6.4 PCR para HPV16 .....	51
6.5 Análise de inibidores da PCR .....	51
6.6 Avaliação da metodologia utilizada .....	52
6.7 Análise estatística de dados clínicos e epidemiológicos .....	53
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>9 ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>

## LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

CCP	Cancêr de cabeça e pescoço
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
CONEP	Conselho Nacional de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E1, E2, E4, E5, E6 e E7	Early regions 1-7
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GENCAPO	Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço
HIM	HPV <i>in Men</i>
HPV	Papilomavírus humano
HSPG	Proteoglicano heparan-sulfato
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
ICESP	Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCR	<i>Long Control Region</i>
mRNA	RNA mensageiro
CEO	Carcinoma epidermoide de orgaringe
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
p53	Gene supressor tumoral
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pRb	Gene de retinoblastoma
PV	Papilomvírus
qPCR	PCR em tempo real / PCR quantitativo
RFLP	<i>Restriction Fragmente Length Polymorphismo</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SPLIT	<i>Precancerous Lesions In the Tonsils</i>
SRC	Família de proteína-tirosina quinase
TAE	Tampão tris-Acetato-EDTA
URR	<i>Upstream regulatory region</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
ng	Nanogramma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
pg	Picogramma
xg	Força gerada em unidades de gravidade

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação dos gêneros de Papilomavírus encontrados em humanos.....	30
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo do genoma do HPV.....	23
<b>Figura 3.</b> Ciclo celular do HPV.....	26
<b>Figura 4.</b> Cripta tonsilar.....	31
<b>Figura 5.</b> A. Escova citológica capaz de obter células epiteliais pré-malignas ou malignas no colo do útero. B. Falta de acessibilidade da escova nas lesões proveniente das tonsilas devido sua anatomia irregular e das lesões estarem nas criptas tonsilares.....	35
<b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos amplificado pela PCR para gene constitutivo da beta-globina (268pb – identificado pelo quadro azul) e para PGMY09/11, controles positivos identificados pelos quadros amarelos (450pb).....	49
<b>Figura 7.</b> Amplificação da curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do padrão. ....	50
<b>Figura 8.</b> Regressão linear da curva padrão da PCR em tempo real da região E7 de HPV 16.....	50
<b>Figura 9.</b> Curva de amplificação de PCR em tempo real para HPV16, demonstrando curvas dos controles positivos de linhagens celulares de CaSki e SiHa .....	51
<b>Figura 10.</b> Amostras negativas “batizadas” com DNA de células CaSki em uma concentração de 1,5 cópias por célula. ....	52
<b>Figura 11. a e b -</b> PCR PGMY09/11.....	53
<b>Figura 12.</b> PCR em tempo real para o tipo viral 16.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diferenças entre tumores HPV positivos e negativos em cabeça e pescoço (50). .....	30
<b>Tabela 2.</b> Cálculo do número de pacientes. ....	43
<b>Tabela 3.</b> Primers que foram utilizados na PCR para gene constitutivo da beta-globina. .....	43
<b>Tabela 4.</b> Primers e sonda utilizados na PCR em tempo real para E7 HPV16.....	44
<b>Tabela 5.</b> Característica da população estudada .....	48
<b>Tabela 6.</b> Dados demográficos e de hábitos conforme local de recrutamento .....	54
<b>Tabela 7.</b> Dados de tabagismo e etilismo conforme escolaridade .....	55
<b>Tabela 8.</b> Quantidade de parceiros conforme relato de infecção por HPV genital.....	56
<b>Tabela 9.</b> Hábito de sexo oral conforme gênero e local de recrutamento.....	56

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Casos de câncer atribuído a agentes infecciosos para ambos sexos em todo o mundo para o ano de 2012.....	29
<b>Gráfico 2.</b> Casos de câncer atribuído a agentes infecciosos para ambos sexos na América do Sul para o ano de 2012. ....	29



## RESUMO

Silva JB. *Prevalência de HPV em tonsila de indivíduos sem câncer* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O Papiloma vírus Humano (HPV) é responsável pela infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo. Clinicamente, os HPVs são divididos em dois grupos; os HPVs de baixo risco, que são associados às verrugas genitais e lesões benignas e os HPVs de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, que se integram ao DNA do hospedeiro e promovem a transcrição de seus oncogenes E6 e E7, associados ao desenvolvimento do câncer. O vírus é responsável por cerca de 99,7% dos tumores de colo do útero e tem sido associado também a tumores na região de cabeça e pescoço. O tipo histológico mais frequente nesta localidade é o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP). Os principais fatores de risco para sua ocorrência são o tabagismo e o etilismo, contudo, 10 a 20% dos pacientes que desenvolvem CECP não tem histórico de utilização destas substâncias. A partir desta evidência, novos fatores de risco, como comportamento sexual, foram descritos para o desenvolvimento do câncer. O HPV é o fator de risco mais recentemente associado ao câncer de orofaringe, em especial o tipo 16. As tonsilas parecem agir como reservatório para o vírus. Há diversas teorias para explicar a maior susceptibilidade da orofaringe à infecção pelo HPV, uma delas seria pelo fato do epitélio ser composto por diversas criptas profundas que possivelmente facilitaria a permanência do vírus. O objetivo deste trabalho é estabelecer a prevalência do HPV em tonsilas de indivíduos sem câncer e comparar os fatores de risco associados à infecção pelo vírus entre pacientes HPV positivos e negativos por meio de questionário epidemiológico. A metodologia para o presente estudo consistiu em selecionar pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, sem suspeita de neoplasia, submetidos aos processos cirúrgicos de uvulopalatofaringoplastia ou tonsilectomia, do serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Paulista. Foi realizada uma entrevista de hábitos de vida, cujo questionário inclui questões sobre o uso de tabaco, álcool e hábitos sexuais. As tonsilas retiradas durante a cirurgia passaram por um corte, para retirada de uma amostra em duplicata de cada tonsila, direita e esquerda, totalizando 113 pacientes incluídos no estudo e 226 amostras analisadas. As amostras foram submetidas à extração de DNA, PCR convencional e PCR em tempo real específica para o HPV 16. Todas as 226 amostras foram positivas para gene constitutivo da beta-globina que determina a integridade do DNA extraído, entretanto, não foram encontradas amostras positivas para presença de DNA viral tanto PCR convencional como na PCR específica para o tipo 16. Embora algumas relações sobre hábitos sexuais não puderam ser analisadas de forma mais abrangente, toda a metodologia utilizada para detecção viral mostrou boa sensibilidade e o estudo pode servir de base para pesquisas futuras no entendimento do comportamento viral em tonsilas de indivíduos sem câncer.

Descritores: Papillomaviridae; Papilomavírus humano; Orofaringe; Tonsila palatina; Prevalência; Reação em cadeia da polimerase; Livre de câncer.

## ABSTRACT

Silva JB. *Prevalence of HPV in Tonsils of Individuals without Cancer* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Human papillomaviruses (HPV) are responsible for the most common sexually transmitted infection in the world. HPVs are clinically divided into two groups, low-risk HPVs, which are related to genital warts and benign lesions, while high-risk HPVs, specially the types 16 and 18, which may integrate into the host DNA and transcribe the oncogenes E6 and E7, are associated with malignant growth. This virus is responsible for approximately 99,7% of cervical cancers and recently was also associated to head and neck tumors. The most frequent histological type of head and neck cancer is the Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and the most important risk factors for its occurrence are smoking and alcoholism. However, 10% to 20% of the patients who develop SCC have no history of these substances consumption. Since that evidence, a new risk factor, sexual behavior, was associated to CECP development. HPV type 16 is the newest risk factor associated with Oropharynx SCC specifically on the tonsils, which seem to work as virus reservoirs. There are several theories that explain the enhanced susceptibility of oropharynx to HPV infection, one of them postulates that the tonsil epithelium, composed of several deep crypts, would possibly facilitate the persistence of the virus, evading from the immune system.

This thesis aims at establishing the prevalence of HPV in tonsils of individuals without any cancer signals and to compare the risk factors associated with viral infection. Patients over 18 years old, both genders, without any suspicions of neoplasm, subjected to surgery procedures or uvulopalatopharyngoplasty and tonsillectomy were invited to enroll. An interview including questions about smoking, alcoholism and sexual habits was performed. Tonsils obtained from the surgeries were cut to extract a duplicated sample from each tonsil, right and left totaling 113 patients included in the study and 226 samples analyzed. The tonsils were submitted to DNA extraction, conventional PCR and real-time PCR specifically for HPV 16.

All 226 sample were positive for  $\beta$ -globin, however, no samples were found positive for the presence of viral DNA precluding the analysis of risk factors. This study could serve as a basis for future research on the understanding of the viral behavior in tonsils of individuals.

Descriptors: Papillomaviridae; Human papillomavirus; Oropharynx; Palatine tonsil; Prevalence; Polymerase Chain Reaction; Cancer-free.

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço acometem diversos sítios anatômicos, como os seios paranasais, a laringe, a hipofaringe, a nasofaringe, a orofaringe e a cavidade oral. O tipo histológico de maior ocorrência dessa neoplasia é o Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) (1). Embora os principais fatores de risco para ocorrência de CECP, sejam a exposição ao tabaco e álcool, a carcinogênese também é causada pela infecção do Papilomavírus Humano (HPV), principalmente pelo tipo considerado de alto risco como o 16. (2, 3).

A infecção pelo HPV é considerada a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo, com prevalência elevada em ambos os sexos. Estima-se que 75% a 80% da população sexualmente ativa seja infectada por um ou mais tipos do vírus em algum momento da vida. (4-6).

É descrito na literatura que uma grande parcela das infecções por HPV permanecem subclínicas e são eventualmente eliminadas pelo sistema imunológico em até 24 meses, entretanto, em alguns casos podem vir a se tornar infecções persistentes. Além disso, o vínculo entre a infecção persistente do HPV e o câncer em diversos sítios anatômicos, já é bem estabelecido e reconhecido (7, 8). A primeira descrição de câncer causado pelo vírus, foi na região do colo do útero e evidências mostram que 99,7% dos casos de câncer de colo do útero é identificado a presença do HPV (9-12). O HPV é ainda potencialmente oncogênico em na região anogenital e da cabeça e pescoço.

Estudos relatam que hábitos sexuais estão sendo fortemente ligadas ao aumento da infecção pelo vírus no sítio da orofaringe em indivíduos sem câncer e a prática de sexo oral é sugerida como a principal via de transmissão do HPV para essa região (7, 13, 14). Estima-se que a detecção dos tipos de HPV oral considerados de alto risco em indivíduos infectados e assintomáticos seja próxima de 3,5% (15).

Recentemente, foi estabelecida a ligação entre o Carcinoma Epidermoide de Orofaringe (CEO) e o HPV, porém a lesão precursora nesse sítio não é totalmente compreendida como no câncer de colo do útero, em que uma lesão precursora de malignidade pode ser detectada. Cerca de 72% dos carcinomas epidermoide de orofaringe associam-se ao vírus na América do Norte. A incidência de CEO causada pela infecção

persistente pelo HPV tem aumentado rapidamente nos Estados Unidos (EUA) e pode ultrapassar o número de casos de câncer de colo do útero ligados ao vírus. (4, 7).

Na orofaringe, o subsítio com maior prevalência de infecção pelo HPV são as tonsilas palatinas, seguido pela base de língua. Näsman et al. (16), avaliaram registros de câncer na Suécia e constataram aumento considerável de casos de câncer tonsilar atribuíveis ao HPV. Enquanto entre 2000 – 2002 a prevalência foi de 68% dos casos, entre 2006 – 2007, aumentou para 93% dos casos (14, 16).

Mais investigações sobre a história natural da infecção pelo HPV na orofaringe de indivíduos sem câncer são necessárias, uma vez que o mecanismo de promoção da neoplasia, principalmente em tonsilas, é desconhecido e não existe triagem disponível para prevenção dessa doença. O presente estudo visa estabelecer a prevalência dessa infecção em nossa população. Essas informações podem auxiliar na maior compreensão dos mecanismos de infecção e oncogênese do HPV na orofaringe, bem como nortear eventuais campanhas de conscientização de grupos de risco eventualmente identificados neste estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Papilomavírus humano

Na Itália, no início do século XX, foi constatado o primeiro relato em relação à etiologia viral relacionada às verrugas cutâneas e genitais causadas pelo HPV. O HPV, contudo, foi identificado por microscopia eletrônica pelos autores Strauss e Shaw somente em 1949 (17, 18). Na década de 70, os Papilomavírus (PVs) eram considerados apenas causadores de verrugas, o que não era visto como um problema de saúde pública por se tratarem de lesões benignas, sendo o interesse por esse vírus apenas acadêmico (18, 19).

Ao final da década de 1970, Harald zur Hausen e colaboradores, levantaram a hipótese de que o HPV estaria ligado ao câncer cervical e que pessoas com hábitos promíscuos, apresentavam maior risco para as verrugas (condilomas acuminados). A comprovação de tal teoria foi publicada pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC) em 1995 e a pesquisa foi ganhadora do Prêmio Nobel de Medicina em 2008 (20).

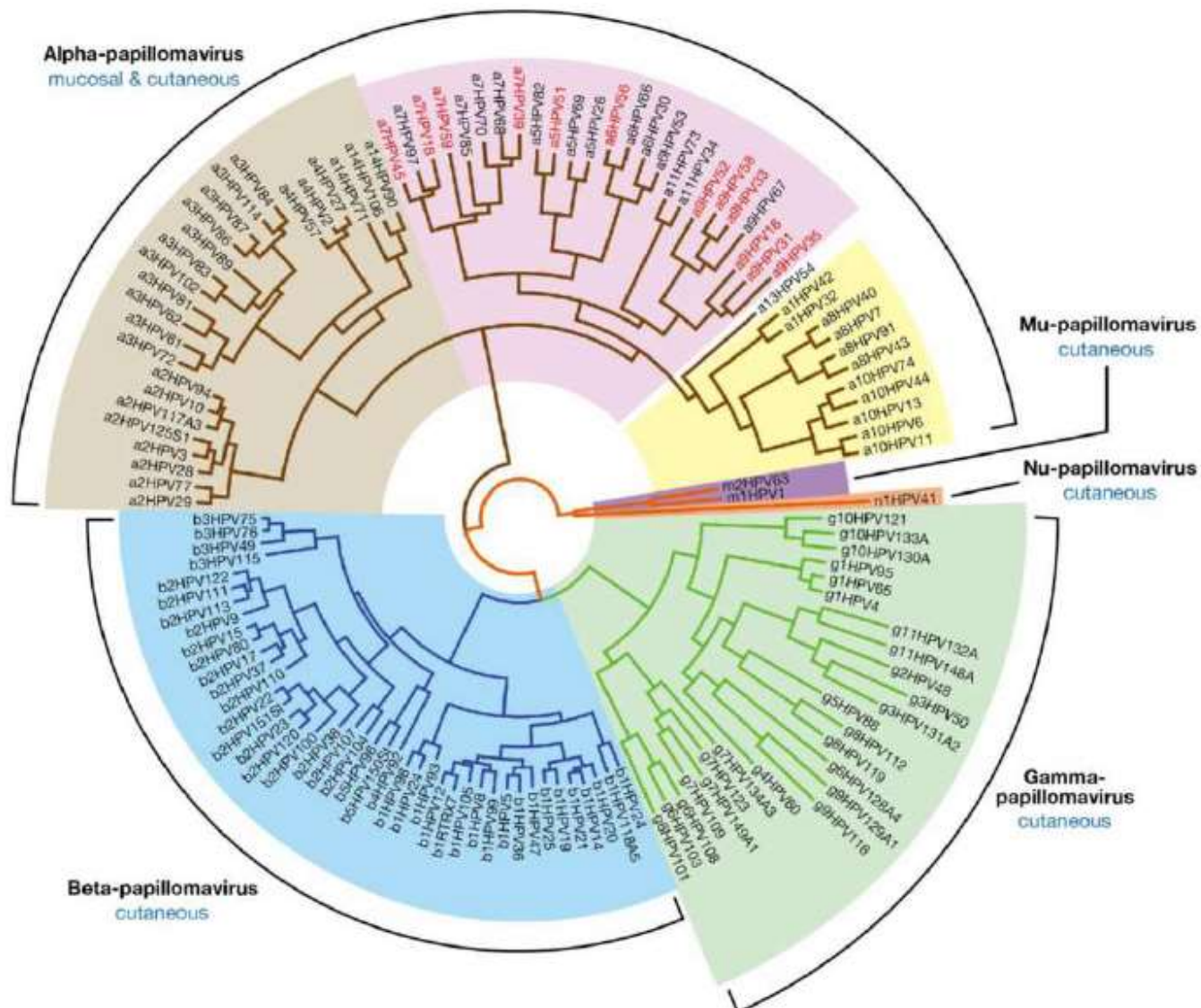
Após o início do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular na década de 80, ocorreu a detecção de dezenas de HPVs em lesões benignas e malignas de mucosa, marco esse considerado uma preparação para uma grande expansão da pesquisa em relação a esse vírus, reforçando a importância de se compreender o comportamento viral (19).

Mais tarde, o HPV passou a ser aceito como agente causador de diversos cânceres. Infecções persistentes por tipos de vírus classificados como de alto risco oncogênico passaram a ser consideradas fatores de risco para ocorrência de lesões precursoras e neoplasias (10).

### 2.2 Taxonomia

Os PVs podem ser encontrados em répteis, aves e em mais de 20 espécies de mamíferos. Na espécie humana, foram identificados aproximadamente 200 tipos diferentes do vírus e de acordo com o *International Committee on the Taxonomy of*

*Viruses* (ICTV), o HPV é pertencente a uma grande família denominada, *Papillomaviridae*. Na Figura 1, estão representados 5 gêneros (*Alpha-*, *Nu/Mu-*, *Beta-* e *Gammapapillomavirus*), classificados com base no sequenciamento de nucleotídeos dos diferentes tipos virais (9, 19, 21).



Fonte: Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I, 2015 (8)

**Figura 1.** Classificação dos gêneros de Papillomavírus encontrados em humanos

A divisão dos gêneros está fundamentada na comparação da sequência de nucleotídeos da região mais conservada do genoma viral (gene L1). Existe uma hierarquia taxonômica composta por: “família”, “espécie”, “tipo”, “subtipo” e “variante”. Desta forma, considera-se um novo tipo de HPV se há diferença de pelo menos 10% na sequência de nucleotídeos da região L1 em relação a um genótipo já conhecido. Caso essa

diferença seja de 2% a 10%, considera-se um subtipo e menos que 2%, uma variante do tipo (8, 22, 23).

Clinicamente, o gênero referido como mais importante é o *Alphapapilomavirus*, gênero com mais amplo estudo nele estão contidos os tipos associados a diversas lesões, como as neoplásicas, assintomáticas e benignas. Os tipos virais desse gênero podem ser classificados de acordo com seu potencial oncogênico (23).

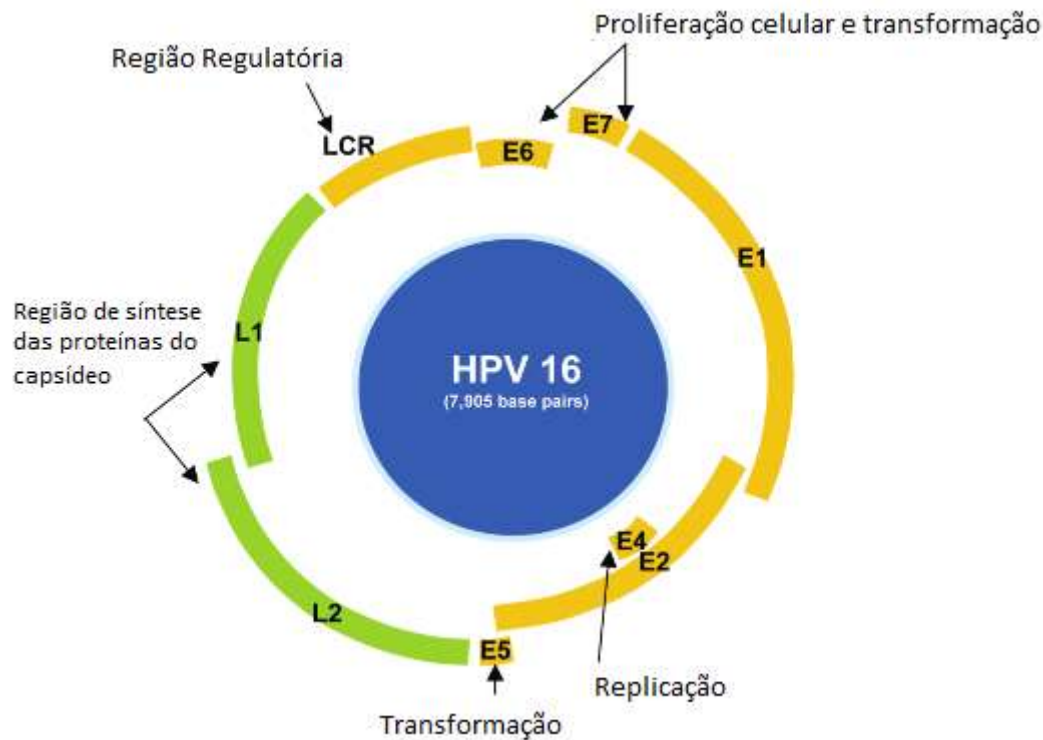
Os tipos encontrados em proliferação benigna (verrugas ou condilomas acuminados), são classificados como HPV de baixo risco oncogênico, como exemplo os tipos 6 e 11. O sistema imunológico costuma depurar esses vírus em aproximadamente 24 meses. Os tipos de HPVs classificados como de alto risco são encontrados em maior frequência nas lesões neoplásicas. Esses tipos virais tem uma maior capacidade de persistência e frequentemente inserem partes específicas do seu genoma no genoma do hospedeiro (9, 24, 25).

A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), classificou 12 tipos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) com risco considerável na promoção de cânceres genitais como: cervical, anal, vagina, vulvar, peniana, além de forte associação com cânceres da região da cabeça e pescoço (11).

### 2.3 Biologia do HPV

Os HPVs são considerados um grupo heterogêneo, porém sua organização e estrutura é a mesma. Tratam-se de vírus epiteliotrópicos pequenos, com partícula viral de aproximadamente 55 nanômetros (nm) de diâmetro e 72 capsômeros. Não são envelopados, apenas envoltos por um capsídeo proteico, que lhes confere uma característica estável e resistente aos solventes orgânicos e aquecimento. Seu genoma é composto por uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla circular com aproximadamente 8000 pares de bases (pb) (5, 23, 26).

O genoma do HPV possui oito regiões denominadas fases de leitura aberta (*Open Reading Frames - ORF*). As ORFs, encontram-se na mesma fita de DNA e são divididas em três, sendo elas a região precoce E que ocupa cerca de 50% do genoma (*Early*), a região tardia L (*Late*) e uma região reguladora, a LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*). Essa região não possui ORFs e tem entre 500 a 1000pb (23, 27). (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Villa LL, 2006 (28)

**Figura 2.** Esquema representativo do genoma do HPV

A região E é responsável por codificar proteínas envolvidas com a replicação viral, transformação celular e apresentação de seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7). A região L codifica proteínas estruturais para formação do capsídeo proteico que será expressa somente em células com infecção produtiva (L1 e L2). Por fim, a região LCR é o local de início da replicação e contém elementos de regulação da transcrição e replicação viral (27, 29).

O gene E1, altamente conservado codifica a DNA helicase necessária para replicação e amplificação do DNA viral. A expressão do E2 tem diversas funções, como ativação ou repressão da transcrição de todos os genes do HPV. Além disso, em cooperação com E1 trabalha no reconhecimento e ligação à origem de replicação, na manutenção da forma episossomal, participa também no processo de divisão celular e auxilia no estabelecimento da infecção (30).

O gene E1 também atua na regulação da expressão dos genes E6 e E7 e a quebra do gene E2 promove a inserção de fragmentos específicos do DNA viral no genoma da célula do hospedeiro, tal processo está associado a progressão maligna devido à perda do controle de expressão dos genes E6 e E7 (8, 30, 31).



O gene E4 dá origem a uma proteína que apresenta possível relação na instabilidade de citoqueratinas e na maturação da partícula viral, favorecendo o processo de diferenciação das células infectadas. Já a proteína proveniente do gene E5 está relacionada com a evasão do sistema imune e tem a função também de aumentar o estímulo de proliferação pela sua ligação com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) (9, 31).

Os genes E6 e E7 tem a importante função de codificar produtos capazes de interagir em diversos processos como os mecanismos de proliferação celular, favorecendo a infecção produtiva, além de dificultar a apoptose e promover a transformação celular. A expressão desses dois genes associados aos genes E1, E2, E4 e E5 são indispensáveis para a replicação viral, síntese e liberação de partículas virais (9, 31).

## **2.4 Ciclo biológico do HPV**

Em relação ao ciclo de replicação do HPV, a infecção dependerá do sítio onde ocorreu a infecção e de fatores como o uso de hormônios, tabagismo, traumas do tecido, entre outros. Esse ciclo é diretamente ligado à diferenciação do epitélio e no contexto do ciclo viral. O HPV codifica proteínas que atuam na reativação da síntese do DNA celular, inibição da apoptose e retardo do programa de diferenciação do queratinócito infectado (32, 33).

Como descrito em literatura, a infecção pelo vírus se dá por meio de microtraumas que acabam por expor células da camada basal (32-34). Acredita-se que para a entrada do genoma viral no núcleo da célula seja necessário uma divisão celular ativa, como a que ocorre durante a cicatrização de feridas (35).

O mecanismo utilizado pelo HPV para entrar na célula ainda não foi totalmente elucidado. Entretanto, tem-se demonstrado que o capsídeo viral seria importante nesse processo, por meio da interação inicial da proteína principal do capsídeo L1 com o proteoglicano heparan-sulfato (HSPG). Ocorre uma mudança conformacional que inclui a clivagem na porção N-terminal da proteína L2, essa clivagem facilita a transferência para um segundo receptor nos queratinócitos basais, processo necessário para a internalização do vírus. A internalização ocorre na maioria das vezes por endocitose via clatrina, seguida pelo desnudamento do capsídeo viral e exposição do genoma por transporte endossomal para dentro da célula. O complexo proteína L2-DNA garante a

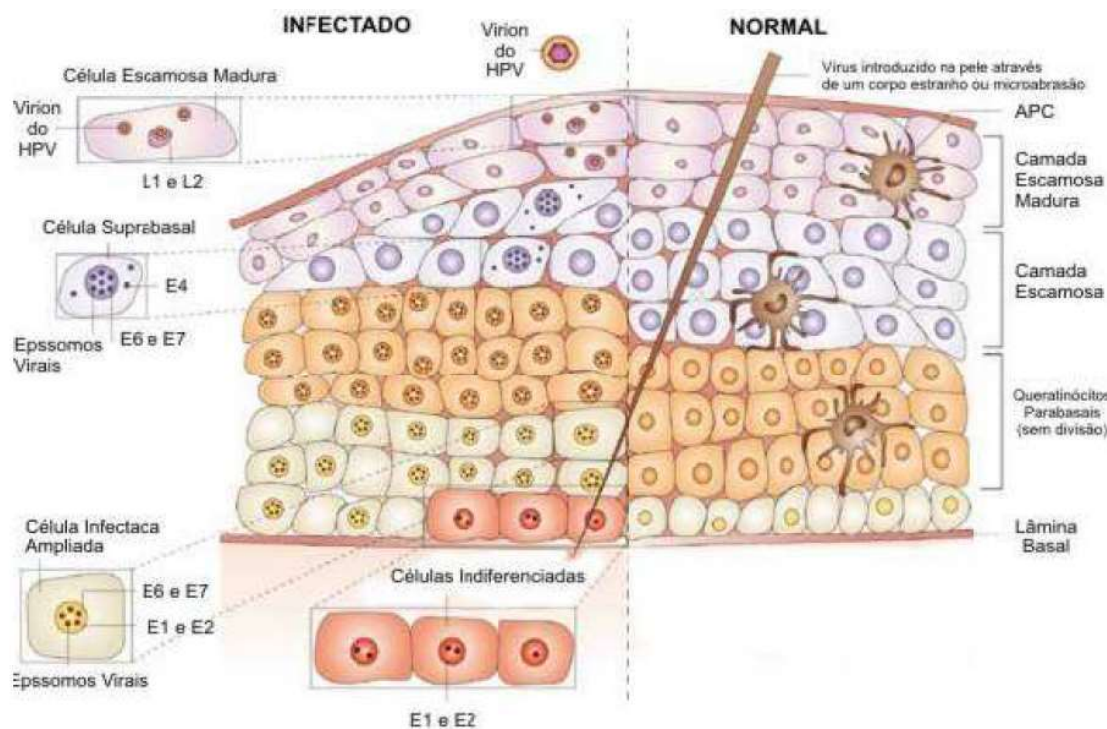
internalização no núcleo celular e a proteína L1 é mantida no endossomo para degradação lisossomal (26, 35, 36).

O vírus que infecta células basais, é mantido em forma epissomal e para que ocorra uma infecção persistente é necessário um número de 50 a 100 cópias do genoma viral por célula (36). Após a infecção das células, ocorre então a distribuição do DNA entre as células filhas, enquanto algumas células continuam seu processo de maturação e diferenciação, outras tem a função de reservatório viral permanecendo indiferenciadas (35, 37).

Na fase inicial da replicação, a transcrição dos genes E1 e E2 é primordial, porém na manutenção de replicação epissomal no momento em que os números de cópias se estabilizam, as mesmas podem ser dispensadas. Com a formação do complexo E1-E2 no início da replicação promove uma distorção no DNA viral que favorece a captação adicional da proteína E1. Essa proteína tem atividade de DNA helicase, fazendo com que o DNA desenrole, formando novos genomas virais. Um detalhe importante da proteína E2 é a capacidade de regulação da expressão de E6 e E7, ativando ou reprimindo de acordo com seus níveis expressos (38). A expressão combinada de E6 e E7 desregula o controle do ciclo celular, impulsionando as células diferenciadas em fase S permitindo que ocorra amplificação do genoma viral e evitando que saiam do ciclo celular (35, 39).

O término desse ciclo viral envolve a expressão dos genes da região tardia L1 e L2. O genoma viral associado a histonas são guiados por E2 para o capsídeo proteico e então a partícula viral é liberada. O papel da proteína E4 não foi completamente elucidado, porém, há indicativos de que sua principal função no ciclo seja na fase tardia, ou seja, na fase de liberação da partícula viral, por meio da associação aos filamentos de queratina celular, afetando a estabilidade mecânica e o aumento da infectividade da partícula formada (35, 37).

A Figura 3 demonstra células do epitélio escamoso cervical e a maturação desse tecido, detalhando o ciclo celular do HPV, expressão das proteínas precoces no início da infecção e expressão dos genes estruturais ao final com a liberação da partícula viral.



Fonte: Adaptado de Frazer IH, 2004 (40)

**Figura 3.** Ciclo celular do HPV

## 2.5 HPV e câncer – carcinogênese

Infecções persistentes causadas por tipos oncogênicos e falha no sistema imunológico podem ocasionar o desenvolvimento da neoplasia, esse processo está intimamente ligado aos genes precoces, E2, E6 e E7. Ao contrário das lesões benignas, em que o genoma viral está epissomal, geralmente nas neoplásicas o encontra integrado ao genoma do hospedeiro (39). Os tipos oncogênicos mais relacionados com neoplasia, principalmente câncer de colo do útero, são o 16 e o 18, sendo o 16 o tipo melhor caracterizado a nível molecular (41, 42).

Para que ocorra a integração, considerado um evento de probabilidade, é necessário a ruptura de genes que regula transcrição normal do vírus, geralmente o local de integração é encontrado nos genes E1 e E2. A ruptura de E2, principalmente, faz com que ocorra uma alta expressão e persistência de E6 e E7. O acúmulo de erros genéticos com a integração e a perda de regulação desses genes é considerado o ponto chave para malignidade (35, 43).

As proteínas E6 e E7 formam complexos com as proteínas celulares supressoras de tumor como, a p53 e a pRB, que inativam suas funções de regulação do ciclo celular. A proteína E6 tem interação com a p53, uma fosfoproteína que atua por meio de várias

vias celulares, como a parada do ciclo celular, apoptose, alterações metabólicas, reparo do DNA e supressão tumoral (43, 44). Em consequência dessa interação, a p53 é degradada, o que resulta no bloqueio da apoptose e aumento da instabilidade cromossômica. Outro importante papel da proteína E6 é promover a ativação da telomerase e das quinases da família SRC, o que ocasiona crescimento celular (2, 39).

A proteína E7 interage com membros da família Rb, essa família de proteínas tem a função de controle de transcrição da fase G1-S por meio da regulação da atividade da família E2F, que por sua vez, consiste em 8 membros que atuam como ativadores ou repressores transcricionais. Essa interação de E7 com Rb causa sua degradação, liberação do fator de transcrição E2F e o aumento de expressão de p16<sup>INK4A</sup>, esse processo irá favorecer a proliferação celular e em conjunto com a alta expressão de E6 estimulará a progressão do ciclo celular, contribuindo assim para a carcinogênese (2, 39).

## **2.6 HPV e neoplasias de cabeça e pescoço**

### **2.6.1 Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço**

Dados do Globocan 2012, revelam que o número estimado de novos casos de câncer para 2025, sem considerar casos de câncer de pele não melanoma, é de aproximadamente 20 milhões para ambos os sexos por ano em todo mundo e para o Brasil, o valor é de 690 mil novos casos (45). O câncer é uma doença de incidência crescente ligada a múltiplos fatores, espera-se que essa doença seja a barreira mais importante para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI. Estimativas do Globocan 2018, indicam para esse ano, 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em geral (46).

O Câncer de Cabeça e Pescoço (CCP) é um problema de saúde pública mundial, por ter alta taxa de morbidade e mortalidade. Sua incidência é crescente e sua etiologia multifatorial, acomete principalmente homens de faixa etária acima de 50 anos com histórico de utilização do álcool e tabaco, que atuam em sinergismo na promoção do câncer (47-49). É uma neoplasia que compreende um grupo anatômico heterogêneo, no qual 90% dos casos são Carcinomas Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) afeta o revestimento mucoso do trato aerodigestório superior, como cavidade oral, a laringe, a faringe e a orofaringe (48-50).

Na América Latina, particularmente no Brasil, a incidência de CECP é relativamente alta e a taxa de sobrevida relativa para esse câncer é de 50 a 70%, levando em conta todos os sítios anatômicos, estágios da doença e o tipo de tratamento realizado. A média de sobrevida no Brasil, para câncer de boca e de orofaringe em 5 anos é de 50% (51, 52).

Dados de câncer de cavidade oral e faringe juntos mostram que ocupam o nono lugar de câncer mais comum diagnosticado em homens, compreendendo 4% dos novos casos para esse sexo, além da mortalidade ser 2,8 vezes maior quando comparado com mulheres. Para câncer de cavidade oral, no ano de 2012, verificou-se 300.400 novos casos e 145.400 mortes, incluindo os casos de câncer de lábio. A incidência do câncer de cavidade oral aumenta em média ao ano 0,6% e a incidência para câncer de orofaringe, principalmente, em tonsilas, tem aumentado em média 2,9% ao ano (1, 53).

No Brasil, estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), indicam 11.200 novos casos de câncer de cavidade oral/orofaringe (C00 – C10) em homens e 3.500 em mulheres para os anos de 2018 e 2019. A neoplasia é considerada o 4º câncer mais frequente na região Sudeste, com incidência estimada de 13,77 casos para cada 100 mil habitantes, sendo que a região Sul é a que apresenta maior incidência, 15,40 casos para cada 100 mil habitantes (47).

Passou-se a observar uma mudança no cenário tradicional dessa neoplasia, houve um aumento crescente do câncer de orofaringe, em destaque o carcinoma tonsilar, e um declínio no câncer de laringe e hipofaringe. Mudanças também foram observadas nos hábitos relacionados a neoplasia como a diminuição do tabagismo e no comportamento sexual das populações como aumento da exposição ao HPV oral pelo sexo oral. (14, 54).

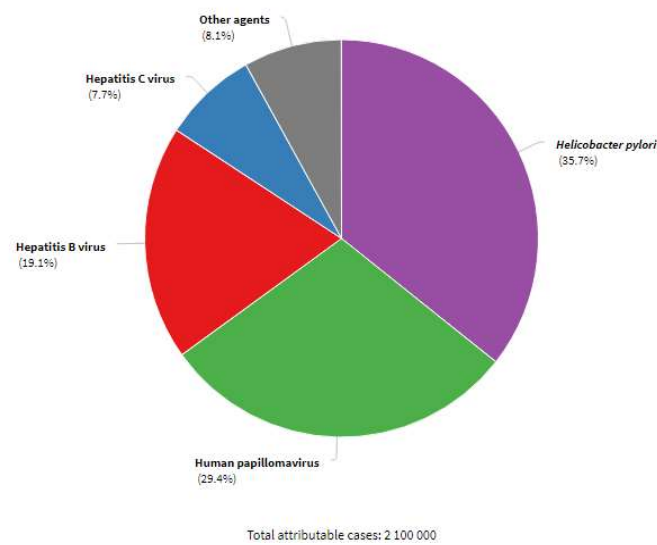
Dados demonstraram que 10 a 20% dos pacientes que desenvolvem CECP não tem histórico de utilização de tabaco e álcool e a identificação da infecção por HPV de alto risco passou a ser considerada um novo fator de risco para ocorrência dessa neoplasia, sendo o tipo viral 16 com maior prevalência em amostras tumorais, representando 90% dos CECP positivos para HPV (49, 55, 56).

No mundo estima-se que 18% dos casos de câncer são atribuídos a agentes infecciosos e para o HPV dados do Globocan destacam, que a infecção pelo vírus foi responsável em 2012 por 29,4% (Gráfico 1) dos casos de câncer no mundo em ambos os sexos, e, na América do Sul, essa porcentagem foi de 48,5% (Gráfico 2) (57). O HPV está presente em 12% dos casos de câncer de faringe, 3% no câncer de boca e 60% nos casos de orofaringe (55, 58).

A prevalência da infecção por HPV especificamente para o câncer de orofaringe, terá variabilidade de acordo com a localização geográfica, como por exemplo, o Japão tem a maior prevalência, enquanto que na África a menor (59).

**Gráfico 1.** Casos de câncer atribuído a agentes infecciosos para ambos sexos em todo o mundo para o ano de 2012

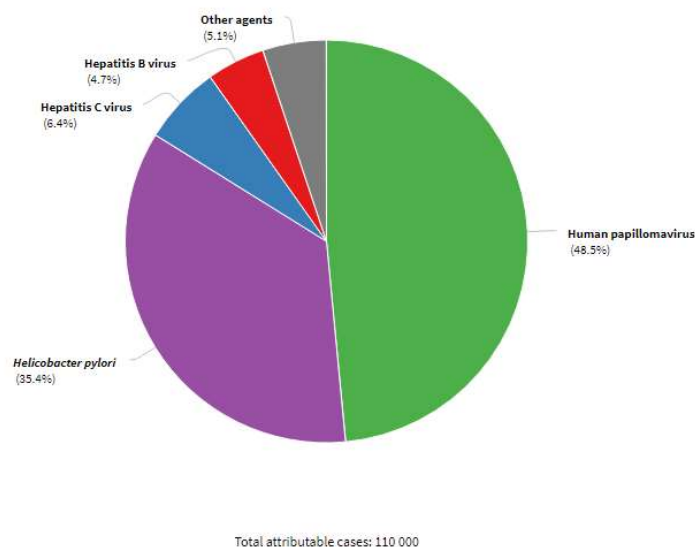
Cancer cases (all infectious agents) among both sexes in 2012 attributable to infections, in the world, shown by infectious agents



Fonte: IARC, 2012 (57)

**Gráfico 2.** Casos de câncer atribuído a agentes infecciosos para ambos sexos na América do Sul para o ano de 2012

Cancer cases (all infectious agents) among both sexes in 2012 attributable to infections, in South America, shown by infectious agents



Fonte: IARC, 2012 (57)

## 2.6.2 Biologia molecular do CECP

Em relação à aspectos moleculares, o câncer como um todo é dependente de um processo de carcinogênese, com múltiplos passos e cancerização de campo, além das vias de sinalização que são alteradas durante a carcinogênese de acordo com o fenótipo de cada tumor. No CECP há subclasses genéticas com diferenças consideráveis entre si, (Tabela 1) como os tumores HPV positivos e tumores HPV negativos (48).

**Tabela 1.** Diferenças entre tumores HPV positivos e negativos em cabeça e pescoço

<b>Característica</b>	<b>HPV-negativo CECP</b>	<b>HPV-positivo CECP</b>
<b>Incidência</b>	Diminuindo	Aumentando
<b>Etiologia</b>	Fumar, uso excessivo de álcool	Sexo oral
<b>Idade</b>	Acima de 60 anos	Abaixo de 60 anos
<b>Cancerização de campo</b>	Sim	Desconhecido
<b>Mutações TP53</b>	Frequente	Não frequente
<b>Local de predileção</b>	Nenhum	Orofaringe
<b>Prognóstico</b>	Desfavorável	Favorável

Fonte: Adaptado de Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, 2011 (48)

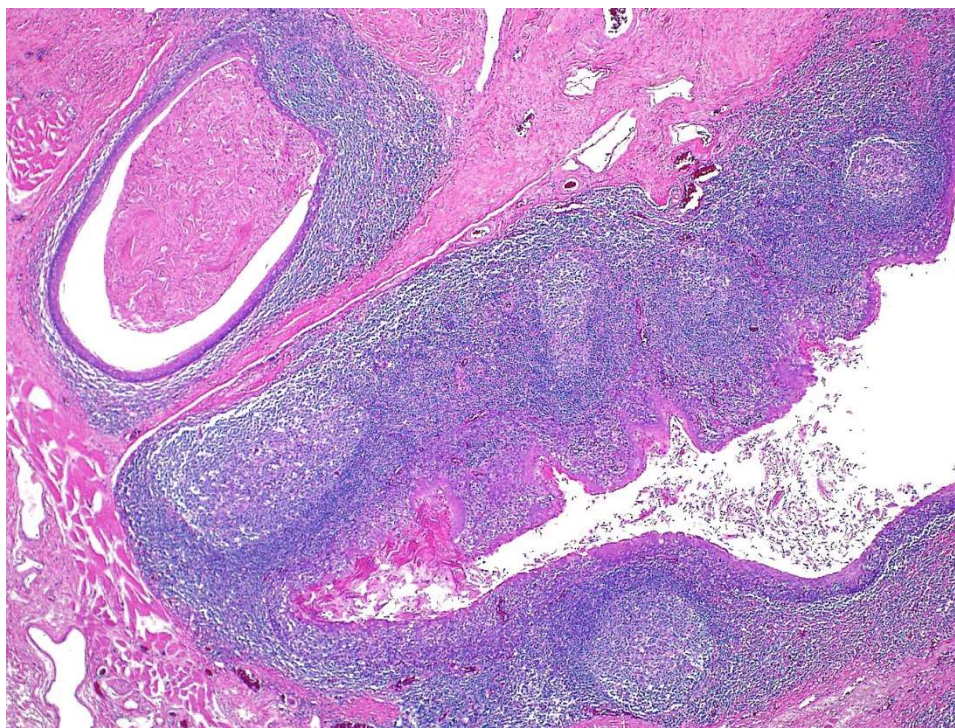
Nos casos de CECP causados pelos fatores de risco habituais (tabaco e álcool) é possível encontrar o gene p53 mutado e uma deleção na região 9p21-22 no início da carcinogênese e como consequência a perda de expressão do gene p16 supressor de tumor (49, 60). Entretanto, os tumores HPV positivos têm expressão diminuída de p53 do tipo selvagem devido à inativação e degradação ocasionada pela oncoproteína E6. Além disso, ocorre uma alta expressão da proteína p16 em decorrência da inativação funcional do Rb pela oncoproteína E7, ambas já descritas, o que resulta no aumento do ciclo celular mesmo com danos no DNA. Essa alta expressão de p16 é evidenciada por meio de imunohistoquímica e usado como marcador clínico para detectar a atividade viral (49, 61). Outra diferença entre os tumores é uma quantidade maior de alterações cromossômicas no tumor HPV negativo (49).

O prognóstico entre os pacientes também difere em relação ao status do HPV. De acordo com alguns estudos, independentemente da idade, estágio da doença, diferenciação tumoral e sexo, a sobrevida dos pacientes com tumores HPV positivo é maior em comparação aos pacientes HPV negativo. Porém, hábitos como fumar podem influenciar negativamente na sobrevida do paciente com câncer orofaríngeo HPV positivo. O risco de recaída e morte aumenta em 1% para cada ano adicional de uso da

substância, deixando claro o comportamento do tumor positivo para HPV, que pode ser alterado biologicamente (49, 62, 63).

### 2.6.3 Tonsila - anatomia, imunologia e HPV

As tonsilas platinas estão localizadas na entrada do trato aerodigestório superior, onde sua função é a proteção contra patógenos que podem ser inalados e ingeridos. A proteção dessa região se dá por meio do mecanismo de defesa inespecífico inato e por reações imunes específicas adaptativas, com grande abundância de células T nessa região (64). A parte superficial das tonsilas é recoberta por um epitélio do tipo escamoso estratificado não queratinizado. As tonsilas são órgãos linfoides sem vasos aferentes e o contato com o antígeno é feito por meio de suas criptas (Figura 4), área na qual o epitélio reticulado é altamente especializado (65-67).



Fonte: Tanaka TI, Alawi F, 2018 (65)

**Figura 4.** Cripta tonsilar

O epitélio das tonsilas forma invaginações profundas denominadas criptas tonsilares. Nas tonsilas palatinas existem aproximadamente de 10 a 30 criptas ramificadas, com a presença de numerosos linfócitos e com invaginações do tecido linfoide. Isso faz com que aumente a área de superfície da tonsila acessível para possível



interação com antígenos (65). O epitélio das criptas e a presença de citocinas produzidas pelo tecido linfóide pode estimular a transcrição, transformação maligna das células e possível progressão do câncer (68).

O epitélio da cripta tonsilar, tem forte expressão do ligante de morte celular programada 1 (PD-L1). O PD1-L1 pode suprimir a resposta das células T, ocasionando um local imuno-privilegiado para infecção por HPV e resistência imune adaptativa, o que devido a persistência do vírus da infecção pode levar à carcinogênese (65).

A infecção pelo HPV é responsável por aproximadamente 5,2% dos cânceres humanos em todo mundo, para infecção oral observa-se que de 5% a 8% dos adultos em todo o mundo estejam infectados pelo vírus (69, 70). Existem diversas teorias para explicar a maior susceptibilidade da orofaringe à infecção pelo HPV. Uma delas é que se trata de uma região recoberta por um epitélio com características semelhantes ao da região genital, onde o HPV é frequentemente encontrado devido à fácil acessibilidade viral ou pelo próprio tipo de tecido considerado mais vulnerável do que outros sítios do trato aerodigestório superior (71, 72). No entanto, os mecanismos pelos quais a infecção de HPV contribui para a ocorrência de neoplasia na cavidade oral permanece sob investigação (65).

Apesar de não saber ao certo se a infecção pelo HPV oral em pacientes saudáveis irá gerar tardiamente um CECP, as tonsilas, principalmente as criptas, parecem estar agindo como reservatório viral. Acredita-se que o biofilme presente nas criptas tonsilares contribuía para que o HPV não seja reconhecido pelo sistema imune (73).

O biofilme é uma comunidade de bactérias aderidas à superfície, suas características clínicas compreendem resistência tanto aos antibióticos, quanto à defesa do organismo. É descrito que o biofilme está presente em vários locais da cabeça e pescoço e que desempenha um papel no processo de infecções crônicas e recorrentes, como nos casos de sinusite (74-77).

A inflamação crônica do tecido oral foi associada a um risco 4 vezes maior em casos de tumor positivos para HPV, a periodontite tem sido proposta para o aumento dessa neoplasia devido ao aumento à acessibilidade viral na camada basal (75).

Em relação a prevalência de HPV em pacientes assintomáticos, no Estados Unidos um estudo relatou uma porcentagem de 6,9% de infecção pelo HPV entre homens e mulheres com idade entre 14 e 69 anos, em análise separada por sexo; para os homens foi uma prevalência de 10,1% e para as mulheres 3,6%, e a prevalência foi declarada maior em homens sexualmente ativos (13).

Em um outro estudo realizado no Reino Unido afim de avaliar também a prevalência do vírus em jovens assintomáticos, encontrou-se uma porcentagem de 4% de infecção oral entre indivíduos de 18 a 25 anos. Neste estudo relatou-se um risco aumentado entre os jovens com comportamento sexual de risco como sexo oral sem proteção (78).

No Brasil, há pouca informação sobre a prevalência de infecção por HPV oral. Um estudo que avaliou diversos sítios anatômicos da orofaringe, identificou 14% de HPV oral e os sítios de maior prevalência foram as tonsilas e o palato mole. De maneira geral, a prevalência de infecção em pacientes assintomáticos é bem discrepante, há uma variação de 0% a 20%. Isso se dá possivelmente pela sensibilidade dos métodos de avaliação empregados, fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes estudados, localização geográfica do estudo e tipo de amostra (raspado, tecido a fresco ou enxague oral) (56, 73, 79).

Uma forte associação à infecção de HPV em pacientes assintomáticos seria o comportamento sexual, em um estudo com a população americana foi relatado que o risco de infecção aumenta principalmente com o aumento do número de parceiros sexuais orais e com o início da vida sexual oral com idade menor ou igual aos 18 anos (13).

Em diversos estudos, a prevalência da infecção é maior entre homens, umas das hipóteses para uma maior susceptibilidade masculina seria a diferença hormonal entre os sexos, que pode afetar o ciclo do vírus na região oral.

Em um estudo realizado para investigar as diferenças na história natural da infecção por HPV oral entre homens e mulheres, avaliou-se material de gargarejo de 409 indivíduos e encontrou uma prevalência de 15% para homens e 6% para mulheres. Neste estudo foi relatado que essa diferença é possivelmente atribuída a diferença de depuração da infecção. Ou seja, as mulheres apresentam maior capacidade de montar resposta imunológica vigorosa contra o HPV genital, com proteção subsequente ao HPV oral. Outro dado de interesse do estudo é o aumento do risco à infecção com o aumento do número de parceiros de sexo oral recentes somente entre os homens. Já entre as mulheres é ressaltado que ocorre uma diminuição do risco com o aumento do número de parceiros vaginais em toda vida (80).

Entre os homens no estudo HIM (The HPV Infection in Men), foi observado que as taxas de aquisição de uma nova infecção oral por HPV se mantêm constantes ao longo da vida. Também foi observado que as infecções prevalentes de HPV em cavidade oral para esse sexo, são mais comuns em faixas etárias avançadas. No estudo, 40% das

infecções que persistiram por mais de 4 anos ocorreram entre homens acima de 45 anos, enquanto nenhuma infecção persistente ocorreu em homens jovens (81, 82).

Devido à alta taxa de presença de HPV em lesões pré-neoplásicas e no próprio câncer, sugere-se que a infecção pelo vírus seria um fator para o desenvolvimento da doença. É necessária a compreensão da real prevalência e persistência da infecção para o entendimento correto da progressão maligna no sítio de orofaringe (15).

## 2.7 Rastreio de HPV em tonsilas

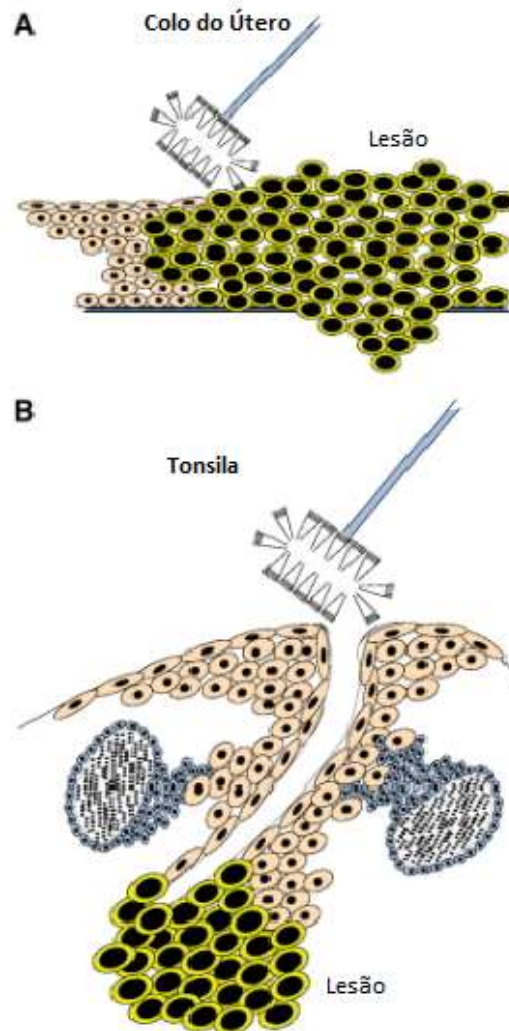
Ainda que o prognóstico nos cânceres de cabeça e pescoço positivos para HPV sejam mais promissores, o CECP é diagnosticado em estágios mais avançados, o que dificulta um tratamento efetivo. Triagem e detecção mais eficazes permitiriam que o tratamento diminuísse a morbidade e mortalidade nesse tipo de neoplasia (83).

Estudos indicam que a infecção por HPV genital e oral são relacionadas, os mesmos tipos encontrados no genital da mulher ou em parceiros sexuais são encontrados no trato oral (84, 85). O padrão ouro para detecção de lesões no colo do útero ou até mesmo no câncer é a biópsia cervical, além da citologia em base líquida que utiliza suspensões de células residuais que detecta alterações induzidas pelo vírus. Existe também o *Papanicolaou*, outro exame de citologia convencional, porém estudos demonstram uma baixa eficácia, devido sua falha na sensibilidade e a taxa de falso negativo pode variar entre 13 a 70% e as taxas de falso positivo 0 a 14% (84, 86, 87).

Os dados sobre a capacidade de rastreio do câncer de orofaringe e principalmente de tonsila em pacientes assintomáticos são limitados, para essa triagem o padrão seria exame visual e tátil convencional, que por vezes, podem vir a escapar em uma primeira avaliação uma vez que as lesões pré-neoplásicas e cânceres precoces podem ser sutis e de difícil caracterização, prejudicando o diagnóstico. Portanto, a adição de técnicas para compor esse método de triagem aumentaria a sensibilidade e especificidade do diagnóstico dessas lesões (88).

O teste com escova citológica não seria o ideal para esse tipo de rastreio devido a diferença de acessibilidade epitelial, o colo do útero é coberto por uma camada plana e uniforme de epitélio escamoso estratificado, no qual a escova citológica é eficaz, visto de maneira diferente quando se trata por exemplo do epitélio tonsilar, caracterizado por um epitélio irregular, que contém invaginações profundas (criptas), onde acredita-se que as lesões pré-neoplásicas tendem a surgir. Diante desse cenário, compreende-se a

impossibilidade de utilização da escova de citologia com podemos observar na (Figura 5) (83).



Fonte: Adaptado de Lingen MW, 2011(83)

**Figura 5.** **A.** Escova citológica capaz de obter células epiteliais pré-malignas ou malignas no colo do útero. **B.** Falta de acessibilidade da escova nas lesões proveniente das tonsilas devido sua anatomia irregular e das lesões estarem nas criptas tonsilares

Métodos moleculares, como a utilização do PCR convencional e em tempo real, são considerados grandes aliados ao teste convencional visual e tátil. O teste em saliva seria uma saída para um diagnóstico mais acurado que apesar de ainda não ter confirmações científicas, determinaria as chances de o paciente desenvolver um CECP associado ao HPV, facilitando o monitoramento médico. Visto que o status de HPV dos tumores determina o manejo clínico do paciente, é de extrema importância investir em métodos de rastreio para o câncer de cabeça e pescoço como um todo, principalmente de

orofaringe. O maior desafio seria o desenvolvimento de teste para a identificação dos HPV's considerados de alto risco, associados aos testes já existentes afim de triar com maior rigor as lesões pré-neoplásicas e os cânceres presentes nas criptas tonsilares (83, 84, 89, 90).

## **2.8 Métodos moleculares para detecção de HPV**

De fato, foi evidenciado pela literatura o comportamento menos agressivo dos tumores de cabeça e pescoço HPV positivo, atribuindo a eles uma maior sobrevivência, menores riscos de progressão e morte quando comparados com pacientes HPV negativo. Portanto, acredita-se que com o melhor entendimento em relação ao comportamento viral nesse grupo de pacientes as terapias se tornem cada vez mais adequadas, reduzindo então sua toxicidade (91, 92).

Assim, a avaliação do status de HPV nos casos de CECP têm grande relevância clínica, apesar de não haver unanimidade em relação a metodologia a ser usada para essa detecção. O protocolo a ser utilizado deve ter precisão, ser tecnicamente aplicável à rotina laboratorial e custo acessível (92).

Teste moleculares que detectam o DNA do HPV ou seus transcritos são considerados altamente sensíveis quando comparados aos testes citopatológicos, além de ser possível também determinar o tipo viral presente na infecção. Devido a essas importantes características o teste molecular é o padrão ouro na identificação viral (87, 92).

A biologia molecular passou a ser utilizada na década de 1980, a partir da comercialização das sondas de ácidos nucleicos. Com o avanço nos últimos anos, métodos com maior sensibilidade e especificidade passaram a serem inseridos não só em estudos epidemiológico, mas também no diagnóstico dos diversos genótipos e múltiplas infecções causadas pelo HPV e os métodos baseados em PCR são amplamente utilizados (10, 87, 92). Os métodos de detecção do genoma viral são diversos, dentre eles destacam-se a Captura Híbrida, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a hibridização molecular, métodos de genotipagem e detecção de RNA mensageiro viral (93).

A captura híbrida é considerada um teste de amplificação de sinal (HC2, Digene, Inc., Qiagen, Gaithersburg, MD), é um método não radioativo que baseia-se na hibridização do DNA-alvo de HPV a partir de sondas de RNA marcadas, os híbridos formados de RNA-DNA são capturado em poços e são detectados por um anticorpo

monoclonal específico e um substrato quimioluminescente, o que possibilita uma aferição semiquantitativa do DNA de HPV capaz de detectar grupos virais de alto e baixo risco (93).

Existem também métodos de amplificação de alvo com a PCR utilizada em diagnósticos e acompanhamento clínico, em teoria tem a capacidade de produzir um bilhão de cópias a partir de uma única fita dupla de DNA. É um processo baseado em termociclagem com amplificação da sequência de um alvo utilizando *primers* tipos-específicos ou *primers* consenso sob a presença de uma DNA polimerase, que permite amplificação de sequências de DNA de diferentes tipos devido ao alvo ser uma região conservada do HPV como a L1, nesse protocolo destacam-se 3 conjuntos de *primers*: os iniciadores PGMY09/11, os SPF10 e o par GP5+/GP6+ (28, 92-94). A análise do produto pode ser feito por meio de gel de eletroforesis em gel de agarose, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), hibridização tipo-específica e sequenciamento (93).

Um outro método baseado também em PCR só que em tempo real, consiste em medir com precisão sequências específicas do ácido nucléico de uma amostra mesmo que em quantidades bem pequenas. Na PCR em tempo real a amplificação pode ser monitorada pelo uso do corante SYBR® Green, um intercalante de DNA ou pelo sistema Taqman® (95).

A metodologia SYBR® Green promove a incorporação do corante na fita de DNA formada, o que resulta na emissão de fluorescência 1000 vezes maior do que quando está em solução livre, umas das vantagens é o baixo custo, entretanto, como desvantagem é a inspecificidade, onde acaba se ligando a toda molécula de DNA como dímeros de iniciadores o que pode gerar um sinal (95).

Já o sistema Taqman® consiste no uso de sondas marcadas com uma molécula fluorescente (*reporter*) na extremidade 5' e uma molécula bloqueadora (*quencher*) na extremidade 3'. Quando essas moléculas estão próximas o sinal do *reporter* é bloqueado pelo *quencher*, assim que a sonda hibridiza em uma sequência de DNA alvo, uma nova fita é produzida por meio da Taq DNA polimerase, que por sua vez tem função 5'nuclease, quebra a sonda e permite que o sinal do *reporter* seja liberado, o que corresponde à amplificação específica da sequência alvo (95).

Além desses métodos estão disponíveis os de genotipagem de HPV, como a hibridização reversa que pode ser usada na identificação de infecção por múltiplos tipos virais (93), o ensaio Linear Array HPV Genotyping (LA) capaz de detectar 37 genótipos e INNO-LiPA HPV Genotyping v2 (Innogenetics, Ghent, Bélgica) que identifica

simultaneamente 28 tipos diferentes, onde ambos são baseados em PCR seguido de hibridização às sondas específica (96, 97). Por fim, para detecção da atividade viral existem métodos baseados na identificação dos mRNA das oncoproteínas E6 e E7, como por exemplo o APTIMA<sup>®</sup> (Gen-Probe/Hologic) (98).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O intuito desse trabalho é o estudo da prevalência de HPV em tonsilas de indivíduos sem câncer em uma população sem fatores de risco previamente conhecidos, para servir de base no entendimento do papel do HPV na história natural do carcinoma de orofaringe, além de estabelecer a relação entre a presença do HPV em tonsilas e hábitos de vida.



## **4 OBJETIVOS**

Estabelecer a prevalência do HPV em tonsilas de indivíduos adultos sem câncer

### **4.1 Objetivos específicos**

- Determinar a prevalência de HPV16 por PCR específica.
- Comparar os fatores de risco associados à infecção pelo vírus entre pacientes HPV positivos e negativos por meio de questionário epidemiológico.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Modelo do Estudo

Trata-se de um estudo transversal

### 5.2 Cálculo da amostra

Para as variáveis contínuas foram calculadas as médias e desvios padrões. Para as variáveis categóricas serão apresentadas frequências e porcentagens.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com auxílio da ferramenta eletrônica disponível em <http://sampsizem.sourceforge.net/iface/>, com base no objetivo primário do estudo, ou seja, proporção em amostra única. Segue estudo do número de pacientes necessários conforme o grau de precisão do IC95% e a previsão de prevalência de positividade para o HPV, admitindo-se  $p < 0,05$ . Para isso, nos baseamos em estudo brasileiro de prevalência do vírus em orofaringe de indivíduos saudáveis (73), que detectou a presença do vírus por esfregaço em 3 de 39 tonsilas (~7,5% de positividade para o local). Assim, para o nosso estudo, foi recrutado um total de 107 pacientes, resultando em aproximadamente 214 amostras com duplicatas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Cálculo do número de pacientes

<b>N (número de pacientes)</b>	<b>IC95% (intervalo de confiança)</b>	<b>Prevalência de positividade para o HPV</b>
<b>73</b>	<b>10%(±5%)</b>	<b>5%</b>
<b>107</b>	<b>10%(±5%)</b>	<b>7.5%</b>
<b>139</b>	<b>10%(±5%)</b>	<b>10%</b>

### 5.3 Casuística

Para o presente estudo, foram convidados pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, sem suspeita de neoplasia, submetidos aos procedimentos cirúrgicos de uvulopalatofaringoplastia ou tonsilectomia, do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Paulista de São Paulo. No total foram incluídos 113 pacientes com essas características acima.

O termo de consentimento entregue ao paciente (ANEXO A), foi elaborado para o projeto de doutorado da aluna Luciana Albina Reis Rosa, com orientação do Dr. José Eduardo Levi, sob o título “Avaliação do perfil genético do HPV16 e seu sítio de integração em células epiteliais normais e neoplásicas da cérvix e tonsilas”, aprovado pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) sob o parecer 173.181 (ANEXO B). Os pacientes do estudo em questão foram os mesmos pacientes recrutados para o projeto de doutorado da aluna descrita acima.

Após assinatura do termo de consentimento, foi realizada uma entrevista de hábitos de vida, cujo questionário incluía questões que englobam o uso de tabaco, álcool e hábitos sexuais. (ANEXO C). O questionário usado, faz parte do projeto temático: “Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço”, realizado pelo grupo de pesquisa GENCAPO (Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço), financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), sob o número 2010/51168-0, com a aprovação da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) registro número 16491 (ANEXO D).

As tonsilas retiradas durante as cirurgias passaram por corte, para obter uma amostra em duplicata de cada tonsila, direita e esquerda, gerando quatro amostras de cada paciente. Cada amostra foi acondicionada em criotubo de 2mL estéril, para armazenamento, transportadas em nitrogênio líquido até o laboratório, em sequência eram conservadas em freezer a -80°C, para realização das técnicas posteriores.

#### 5.4 Extração de DNA

Para extração foi utilizado o kit Qiagen DNeasy blood & tissue kit, seguindo o protocolo do fabricante, que orienta a adição de 20µL de Proteinase K (10mg/ml – USB corporation), para promover a digestão enzimática e lise do tecido seguida da adição de 180µL de Tampão ATL. As amostras foram incubadas à temperatura de 56°C por 16 horas. Em seguida foi adicionado 200µL de Tampão AL, para completar a lise dos tecidos e etanol na concentração de 96%-100%, para agrupar as moléculas de DNA. As amostras lisadas foram transferidas para a coluna QIAamp MinElute em um tubo de coleta de 2mL, em seguida adicionado na coluna 500µL de Tampão AW1 e 500µL de Tampão AW2 para lavagem, após esse processo, os tubos seguiram para centrifugação a 20.000xg por 1 minuto e a coluna transferida para um tubo de 1,5mL onde aplicou-se 20-100µL de Tampão AE no centro da membrana e uma nova centrifugação a 20.000xg por 1 minuto, separando apenas o DNA.

Para verificação da concentração e a pureza, todas as amostras extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade), após esse processo todas as amostras de DNA foram padronizadas a 50ng/µL em um volume final de 100µL, então seguiram para o freezer à temperatura de -20°C.

#### 5.5 PCR para gene constitutivo beta-globina

Para determinação da integridade do DNA extraído, as amostras foram amplificadas pela PCR do gene constitutivo da beta-globina, que amplifica fragmento de 268pb, utilizando os iniciadores PCO4 e GH20 (Tabela 3), partindo de 250ng de DNA (94).

**Tabela 3.** Primers que foram utilizados na PCR para gene constitutivo da beta-globina

Primer	Sequência
PCO4	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'
GH20	5' - GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'

## 5.6 Detecção do HPV por PCR convencional

Foi realizada a PCR com os iniciadores PGMY09/11 que amplificam fragmentos de 450pb da região L1 do HPV de vários tipos virais, é considerado padrão ouro na detecção do vírus, nessa reação foi possível verificar presença ou ausência do DNA viral (94). A PCR foi realizada no termociclador com volume final de 25µL, dos quais foram utilizados 10uM de iniciadores e 250ng de DNA extraído. Os ciclos das reações foram realizados seguindo o protocolo para amplificação: 40 ciclos (95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minutos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos).

Todas as amostras foram submetidas à PCR, utilizando beta-globina para testar o método de extração e evitar falsos negativos, uma vez que esse gene é comum a todos seres humanos.

Após a PCR, os produtos da reação foram analisados por meio de eletroforese submetido a uma corrente constante de 100 amperes por 30 minutos. O gel de agarose foi realizado a 1,5% (Agarose Ultrapure TM – Invitrogen Life Technologies) com tampão TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA), corados com 0.05mg brometo de etídio e em seguida visualizados sob luz ultravioleta (UV).

Após esse processo as amostras seguiram para realização da técnica de PCR específica para HPV16.

## 5.7 PCR em tempo real para HPV16

A técnica de PCR específica para o HPV16 foi realizada com o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), com os iniciadores específicos (Tabela 4) da região E7 do HPV16 que amplificam aproximadamente 100pbs (10), e uma sonda específica para essa região, desenhada no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, para o projeto de doutorado da aluna Cristina Mendes de Oliveira (99).

**Tabela 4.** Primers e sonda utilizados na PCR em tempo real para E7 HPV16

Primer	Sequência
Forward	5' - GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC - 3'
Reverse	5' - GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG - 3'
Sonda	5' - / FAM/ CAA GCA GAA CCG GCA AG / MGB / 3'

A PCR em tempo real foi realizada com termociclador QuantStudio® 5 Real-Time PCR System (*ThermoFisher Scientific*). O volume final das reações era de 12,5µL, nas quais foram utilizados 125ng de DNA, 400nM de iniciadores HPV16-E7 senso e anti-senso, 200nM da sonda específica para HPV16, o volume final era completado com água livre de DNase RNase (*Life Technologies, USA*). Os ciclos das reações foram realizados seguindo o protocolo para amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 42 ciclos de (95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto). Foram usados como controles positivos DNA extraído das linhagens celulares SiHa (1 cópia de HPV 16 por célula) e CaSki (600 cópias de HPV 16 por célula) e, como controle negativo, água.

As análises das curvas de amplificação foram realizadas no software do equipamento citado.

### **5.8 Determinação de sensibilidade analítica**

Para essa determinação foi construída uma curva padrão para HPV16, utilizando DNA extraído de células CaSki na concentração de 55,3ng/µl. Foram adicionados 4,77µl de CaSki a uma amostra negativa para presença do HPV proveniente do estudo, com um volume de 95,3µl, em uma concentração de 50ng/µl, obtendo então, 100µl. Sabendo que, 1 célula diploide possui 6,6pg de DNA e que a linhagem celular de CaSki possui 600 cópias de HPV16 por célula, foi produzida uma solução de 100µl de DNA tonsilar com 3 x 10<sup>7</sup> cópias de HPV16 por célula. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas sempre em um *background* de DNA tonsilar humano 50ng/µL até obter 3 x 10<sup>-7</sup> cópias de HPV16 por célula no mesmo volume.

A realização dessa reação foi realizada nos mesmos padrões da PCR específica para HPV16, em 10 replicatas para cada ponto da diluição e posteriormente a sensibilidade analítica foi determinada por análise Probit.

### **5.9 Análise de inibidores da PCR**

Para avaliar inibidores da PCR, foi realizado o “batismo” de 10 diferentes amostras de DNA tonsilar pertencentes ao estudo, previamente conhecidas como negativas, por meio da PCR convencional e específica para HPV, utilizando célula CaSki

em concentração de 1,5 cópias por célula. As amostras foram submetidas à PCR em tempo real para HPV do tipo 16 em duplicatas.

### **5.10 Avaliação da metodologia utilizada**

Para confirmação da metodologia utilizada no estudo, foram analisadas amostras de CEC de orofaringe do projeto “Análise Demográfica, Clínica, Histopatológica e Molecular de Pacientes com Neoplasia de Cabeça e Pescoço e Tireoide”, aprovado pela CONEP (Conselho Nacional de Saúde) sob o parecer 743.366 (ANEXO E), provenientes do Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), cedidas pelo Prof. Dr Leandro Luongo Matos.

Foi realizado todo o processo, igualmente feito com as amostras de tonsilas de pacientes sem câncer, respeitando as mesmas condições e protocolos. Foram selecionadas 38 amostras a fresco sem conhecimento prévio do status HPV.

### **5.11 Análise estatística de dados clínicos e epidemiológicos**

Os dados obtidos por meio do questionário foram adicionados ao Excel (Microsoft® Office Professional 2013), para posteriormente serem analisados no programa estatístico JMP® Pro 11.0.0.

Para análise de dados contínuos paramétricos foi utilizado t-Test e para apresentação desses dados a média. Análise de dados contínuos não paramétricos foi utilizado Wilcoxon e para apresentação foram utilizados mediana e intervalo interquartil (QII).

Para dados categóricos foram apresentados por meio de porcentagem e as ferramentas utilizadas para análises foram Teste Exato de Fisher e Person.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Casuística**

Foram incluídos no estudo 113 pacientes provenientes dos dois hospitais participantes, que geraram 452 amostras. O período de coleta iniciou-se em 30 de janeiro de 2013, finalizando em 14 de setembro de 2016. Para análise foram selecionadas 1 amostra da tonsila direita e 1 da esquerda, de cada paciente, totalizando 226 amostras analisadas em todo o estudo. Foram incluídas 47 mulheres de 18 a 58 anos, com idade média de 28 anos e 66 homens de 18 a 68 anos, com idade média de 34 anos (Tabela 4).

Na Tabela 5 é possível analisar dados de raça, escolaridade, tabagismo, etilismo geral dos participantes que aceitaram responder o questionário, sendo que dos 113 participantes 81 (71,68%) responderam o questionário de maneira geral e destes, 46 (40,71%) aceitaram responder a parte de hábitos sexuais.



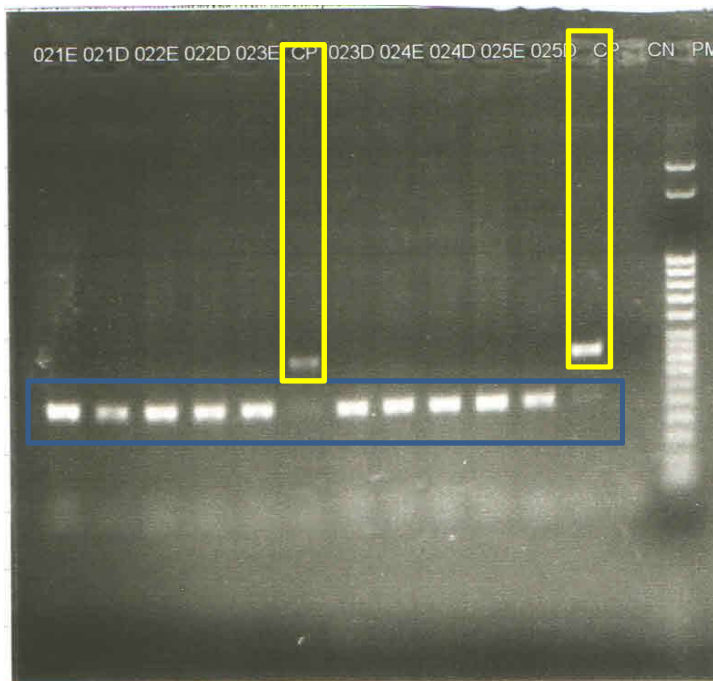
**Tabela 5.** Característica da população estudada

<b>No (total)</b>	<b>113 (100%)</b>
Hospital das Clínicas (FMUSP)	48 (42,48%)
Hopital Paulista	65 (57,52%)
<b>Gênero</b>	
Feminino	47 (41,60%)
Masculino	66 (58,40%)
<b>Idade média (DP)* em anos</b>	
Feminino	28,5 (18-58) anos
Masculino	34 (18-68) anos
<b>Resposta ao questionário de hábitos de vida</b>	
Sim	81 (71,68%)
Não	32 (28,32%)
<b>Resposta ao questionário de hábitos sexuais</b>	
Sim	46 (40,71%)
Não	67 (59,29%)
<b>Raça</b>	
Amarelo (asiático)	2 (1,77%)
Branco	66 (58,41%)
Negro	11 (9,73%)
Pardo ou Mulato	16 (14,16%)
Missing	18 (15,93%)
<b>Escolaridade</b>	
Analfabeto	1 (0,88%)
Ensino fundamental incompleto	9 (7,96%)
Ensino fundamental completo	13 (11,50%)
Ensino médio completo	50 (44,25%)
Ensino superior completo	24 (21,24%)
Missing	16 (14,16%)
<b>Tabagismo</b>	
Sim	4 (3,54%)
Não	65 (57,52%)
Somente no passado	12 (10,62%)
Missing	32 (28,32%)
<b>Etilismo</b>	
Sim	37 (32,74%)
Não	37 (32,74%)
Somente no passado	5 (4,42%)
Missing	34 (30,10%)
<b>Relação sexual (vaginal, ou oral, ou anal)</b>	
Sim	43 (93,48%)
Não	3 (6,52%)
<b>Sexo oral (avito)</b>	
Sim	34 (73,91%)
Não	11 (23,91%)
Não quis responder	1 (2,17%)
<b>Idade que realizou sexo oral pela primeira vez</b>	
Média (anos)	18,8 anos

\*Desvio Padrão

## 6.2 Tecido a fresco e PCR convencional

Todas as 226 amostras foram positivas para gene constitutivo da beta-globina, entretanto, nenhuma amostra foi positiva para a detecção viral (Figura 6).



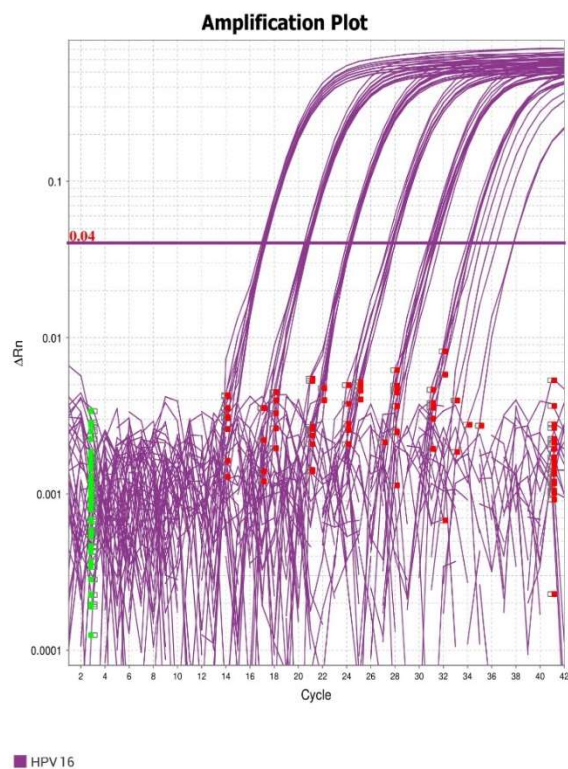
**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos amplificado pela PCR para gene constitutivo da beta-globina (268pb – identificado pelo quadro azul) e para PGMY09/11, controles positivos identificados pelos quadros amarelos (450pb)

## 6.3 Sensibilidade analítica

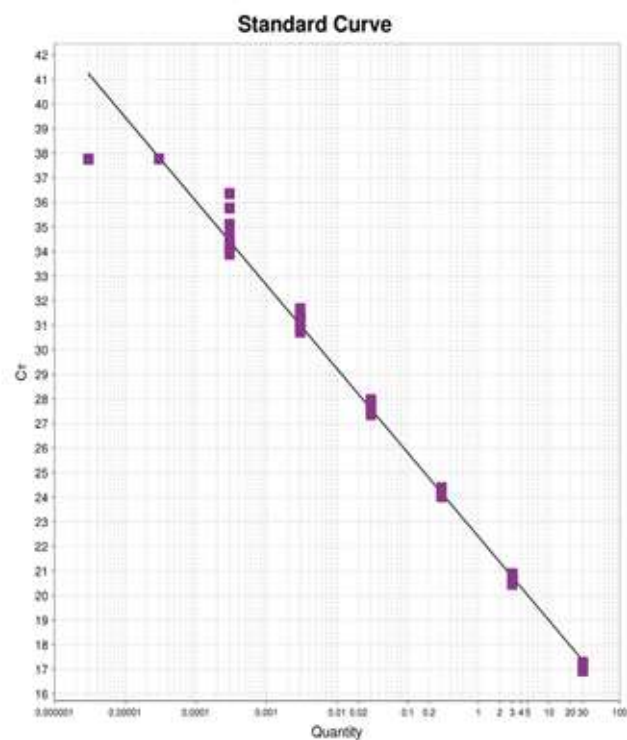
Afim de atestar a fidelidade e qualidade da PCR específica utilizada no estudo, foi realizado a construção de uma curva padrão para verificação do limite de detecção. A partir de um padrão conhecido foi possível ver uma boa sensibilidade da reação. Foram analisados em 10 replicatas para cada ponto da diluição seriada (Figura 7).

A sensibilidade analítica da reação foi determinada por análise Probit, estabelecendo-se o limite de detecção (95%), que foi de 0,0002 cópias por célula.

Obteve-se regressão linear com um índice de correlação de 0,991 para os pontos de HPV 16, portanto, próximo ao ideal (Figura 8).



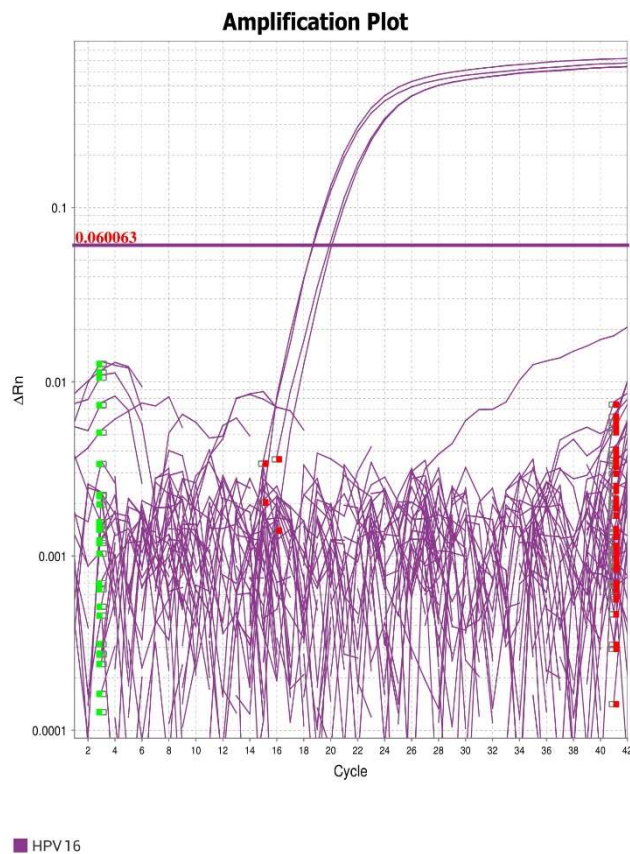
**Figura 7.** Amplificação da curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do padrão



**Figura 8.** Regressão linear da curva padrão da PCR da região E7 de HPV 16

## 6.4 PCR para HPV 16

Todas as 226 amostras foram negativas para presença do DNA viral (Figura 9).

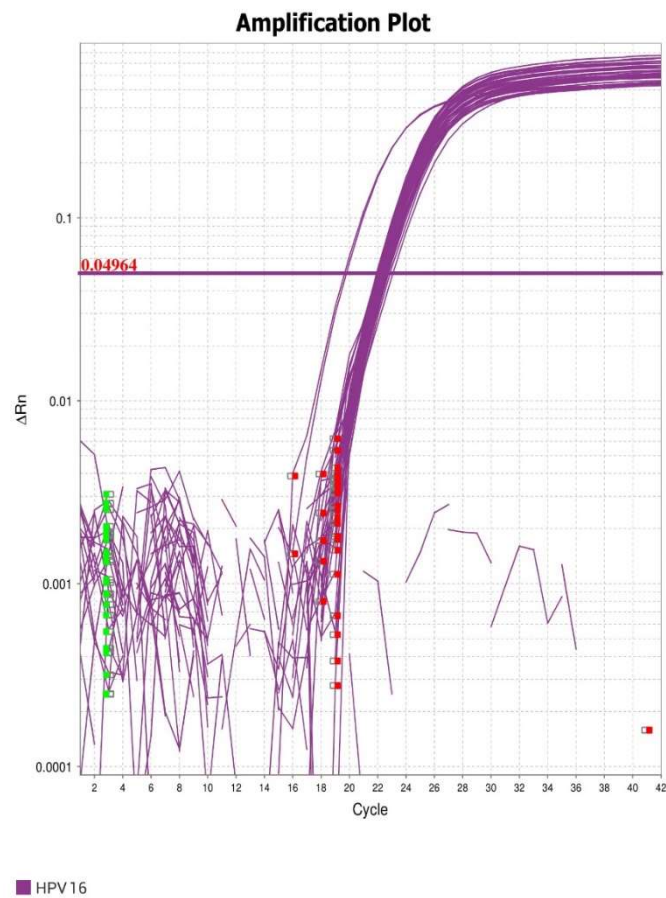


**Figura 9.** Curva de amplificação de PCR em tempo real para HPV16, demonstrando curvas dos controles positivos de linhagens celulares de CaSki e SiHa

## 6.5 Análise de inibidores da PCR

Para avaliação da possibilidade de haver algum inibidor da PCR que pudesse influenciar no resultado, foi realizado o “batismo” de 10 DNA de pacientes aleatórios, previamente conhecidos como negativos na PCR convencional e específica. Esse “batismo” foi feito com DNA de células CaSki, com concentração previamente conhecida de 1,5 cópias por célula.

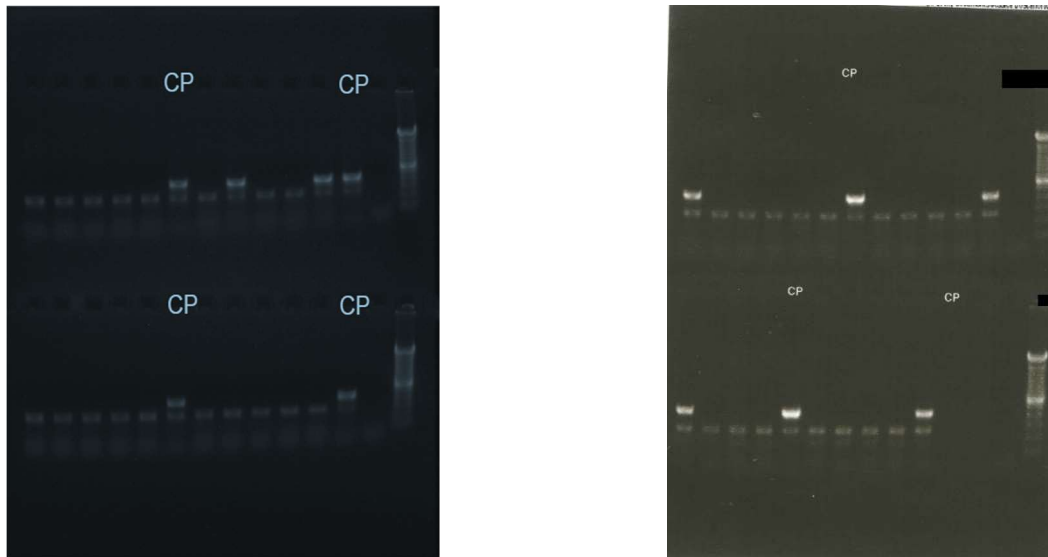
Não se observou inibidores, uma vez que todas as amostras submetidas à PCR em duplicata foram positivas (Figura 10).



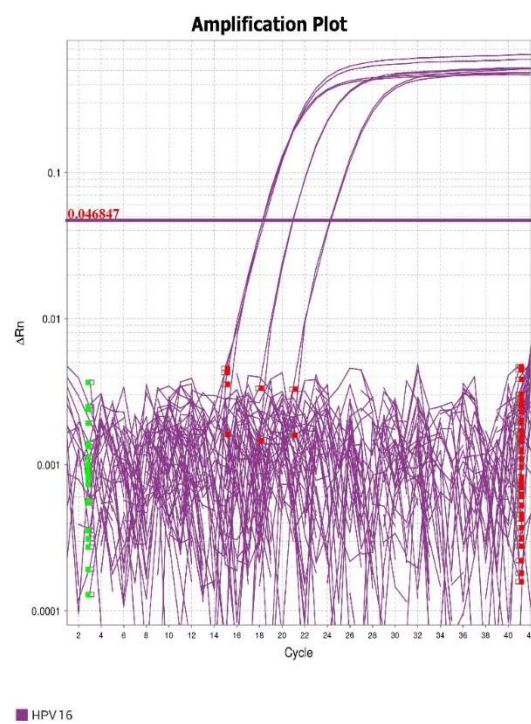
**Figura 10.** Amostras negativas “batizadas” com DNA de células CaSki em uma concentração de 1,5 cópias por célula

### 6.6 Avaliação da metodologia utilizada

As amostras de tumores foram positivas para beta-globina, dentre essas, 4 foram positivas para PCR com iniciadores PGMY09/11 (Figura 11 a e b) e destas, 2 foram também positivas para PCR em tempo real para o gene E7 no HPV16 (Figura 13)



**Figura 11. a e b - PCR PGMY09/011**



**Figura 12. PCR em tempo real para o tipo viral 16**

### **6.7 Análise estatística de dados clínicos e epidemiológicos**

Por meio do questionário aplicado aos participantes que aceitaram responder, foi possível realizar análises estatísticas em relação à hábitos de vida. Dados comparativos entre os dois hospitais participantes como sexo, idade, hábitos sexuais, carga tabágica e

etífica estão na Tabela 6. Foi realizada também análise dos hábitos de tabagismo e etilismo conforme escolaridade (Tabela 7), comparação entre quantidade de parceiros sexuais e presença de HPV genital auto referida, além de comparação do hábito de sexo oral ativo conforme sexo e hospital (Tabela 8 e 9).

**Tabela 6.** Dados demográficos e de hábitos conforme local de recrutamento

	Hospital da Clínicas	Hospital Paulista	
<b>Gênero</b>	48(%)	65(%)	p 0.0332 <sup>a</sup>
Feminino	14 (29,17%)	33 (50,77%)	
Masculino	34 (70,83)	32 (49,23%)	
<b>IDADE (mediana/QII)*</b>	48	65	p 0.0001c
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	36 (29 - 46,75)	26 (20 - 33)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	19 - 62	18 - 57	
<b>ESCOLARIDADE</b>	48(%)	49(%)	p 0.00025 <sup>a</sup>
Analfabeto	1 (2,08%)	0 (0%)	
Fundamental Incompleto	8 (16,67%)	1 (2,04%)	
Fundamental Completo	11 (22,92%)	2 (4,08%)	
Ensino Médio	22 (45,83%)	28 (57,14%)	
Ensino Superior	6 (12,50%)	18 (36,74%)	
<b>HÁBITOS SEXUAIS</b>			
<b>Resposta ao Questionário sexual</b>	48(%)	65(%)	p 0.5679 <sup>a</sup>
Sim	18 (37,5%)	28 (43,08%)	
Não	30 (62,5%)	37 (56,92%)	
<b>Verrugas Genitais</b>	18(%)	28(%)	p 1.0 <sup>a</sup>
Não sei	0 (0%)	1 (3,58%)	
Não	18 (100%)	27 (96,43%)	
<b>HPV genital*</b>	18(%)	28(%)	p 0.7200 <sup>b</sup>
Sim	2 (11,11%)	3 (10,7%)	
Não sei	0 (0%)	1 (3,6%)	
Não	16 (88,89%)	24 (85,7%)	
<b>Relação Sexual (vaginal, ou oral, ou anal)</b>	18(%)	28(%)	p 0.2696 <sup>a</sup>
Sim	18 (100%)	25 (89,29%)	
Não	0 (0%)	3 (10,71%)	
<b>Quantidade de parceiros sexuais (mediana/IIQ)*</b>	12	23	p 0.0018 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	10 (5 - 19)	3 (2 - 6)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	1 - 50	0 - 10	
<b>Quantidade de parceiros sexuais</b>	18(%)	28(%)	p 0.2973 <sup>b</sup>
0	0 (0%)	3 (10,71%)	
1	1 (5,56%)	2 (7,14%)	
Entre 2 e 5	5 (27,78%)	12 (42,86%)	
Entre 6 e 10	6 (33,33%)	7 (25%)	
Entre 11 e 20	4 (22,22%)	1 (3,57%)	
Entre 21 e 50	2 (11,11%)	2 (7,14%)	
Entre 51 e 100	0 (0%)	1 (3,57%)	
<b>Quantidade de parceiros sexuais regulares (mediana/IIQ)*</b>	15	23	p 0.1978 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	3 (1 - 8)	2 (1 - 5)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	1 - 12	1 - 8	
<b>Quantidade de parceiros sexuais regulares</b>	3(%)	3(%)	p 0.5134 <sup>b</sup>
Entre 2 e 5	2 (66,67%)	1 (33,33%)	
Entre 6 e 10	1 (33,33%)	1 (33,33%)	
Entre 11 e 20	0 (0%)	1 (33,33%)	
<b>Quantidade de parceiros sexuais casuais (mediana/IIQ)*</b>	14	22	p 0.0175 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	4 (1,75 - 10,5)	1,5 (0 - 4)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	0 - 38	0 - 7	
<b>Quantidade de parceiros sexuais casuais</b>	3(%)	3(%)	p 0.3430 <sup>b</sup>
Entre 2 e 5	1 (33,33%)	0 (0%)	
Entre 11 e 20	1 (33,33%)	0 (0%)	
Entre 21 e 50	1 (33,33%)	2 (66,67%)	
Entre 51 e 100	0 (0%)	1 (33,33%)	
<b>Dos casuais, quantos pagou ou recebeu dinheiro ou drogas para fazer sexo (mediana/IIQ)*</b>	18	25	p 0.0366 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	0 - 4	0 - 0	
<b>Sexo oral (ativo)</b>	18(%)	28(%)	p 0.1681 <sup>b</sup>
Sim	16 (88,89%)	18 (64,29%)	
Não	2 (11,11%)	9 (32,14%)	
Não quis responder	0 (0%)	1 (3,57%)	

Continua

<b>Idade de início do sexo oral (mediana/IIQ)*</b>	15	16	p 0.2077 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	18 (17 - 22) anos	18 (16 - 19) anos	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	30 - 13 anos	22 - 15 anos	
<b>Frequência mensal do sexo oral</b>	16	19	p 0.6473 <sup>c</sup>
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	2 (2 - 8)	3 (1 - 8)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	1 - 12	1 - 12	
<b>Gênero dos parceiros em quem realizava sexo oral</b>	16(%)	19(%)	p 0.1841 <sup>b</sup>
Mulheres	11 (68,75%)	8 (42,11%)	
Homens	5 (31,25%)	9 (47,37%)	
Mulheres e Homens	0 (0%)	2 (10,53%)	
<b>Sexo oral (passivo)</b>	18(%)	28(%)	p 0.2650 <sup>b</sup>
Sim	14 (77,78%)	16 (57,14%)	
Não	4 (22,22%)	10 (35,71%)	
Não quis responder	0 (0%)	2 (7,14%)	
<b>Boca no ânus do parceiro(a)</b>	18(%)	28(%)	p 1.0 <sup>a</sup>
Sim	3 (16,67%)	4 (14,29%)	
Não	15 (83,33%)	24 (85,71%)	
<b>CARGA TABÁGICA (mediana/ IIQ)*</b>	16	13	p 0.1825 <sup>c</sup>
Mediana em gramas (IIQ) (25% - 75%)	1,625 (0 - 14,35)	0 (0 - 2,375)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	0 - 20,5	0 - 12,75	
<b>CARGA ETILICA (mediana/ IIQ)*</b>	32	48	p 0.0042 <sup>c</sup>
Mediana em gramas (IIQ) (25% - 75%)	53,2951 (1,47938 - 661,006)	0 (0 - 81,9292)	
Mínimo (0,0%) e Máximo (100%)	0 - 34973,3	0 - 4990,99	

<sup>a</sup>Teste Exato de Fisher<sup>b</sup>Person<sup>c</sup>Wilcoxon<sup>d</sup>t Test

\*Abreviações: HPV: Papiloma Vírus Humano/ QII: Intervalo Interquartil

**Tabela 7.** Dados de tabagismo e etilismo conforme escolaridade

Tabagismo/Escolaridade	Tabagismo ou Etilismo		p
	Sim	Não	
<b>Tabagismo/Escolaridade</b>	Sim 16(%)	Não 64(%)	p 0.1481 <sup>b</sup>
Analfabeto	0 (0%)	1 (1,56%)	
Ensino fundamental incompleto	3 (18,75%)	2 (3,13%)	
Ensino fundamental completo	3 (18,75%)	7 (10,94%)	
Ensino médio	6 (37,50%)	36 (56,25%)	
Ensino superior	4 (25%)	18 (28,13%)	
<b>Tabagismo/ Escolaridade (dicotômica)</b>	Sim 16(%)	Não 64(%)	p 0.0504 <sup>b</sup>
Analfabeto/Ensino fundamental incompleto e completo	6 (37,50%)	10 (15,63%)	
Ensino médio/Ensino superior	10 (62,50%)	54 (84,38%)	
<b>Etilismo/Escolaridade</b>	Sim 42(%)	Não 37(%)	p 0.8250 <sup>b</sup>
Analfabeto	0 (0%)	1 (2,70%)	
Ensino fundamental incompleto	3 (7,14%)	2 (5,14%)	
Ensino fundamental completo	6 (14,29%)	4 (10,81%)	
Ensino médio	22 (52,38%)	19 (51,35%)	
Ensino superior	11 (26,19%)	11 (29,73%)	
<b>Etilismo/Escolaridade (dicotômica)</b>	Sim 42(%)	Não 37(%)	p 0.7818 <sup>b</sup>
Analfabeto/Ensino fundamental incompleto e completo	9 (21,43%)	7 (18,92%)	
Ensino médio/Ensino superior	33 (78,57%)	30 (81,08%)	

<sup>b</sup>Person



**Tabela 8.** Quantidade de parceiros conforme relato de infecção por HPV genital

Quantidade de parceiros sexuais (mediana/IIQ)*	Presença de HPV*		p 0.0631 <sup>c</sup>
	Sim	Não	
Mediana (IIQ) (25% - 75%)	10 (5,5 - 15)	4 (2 - 9)	
Mínimo (0,0%) e máximo (100%)	4 - 20	0 - 50	

<sup>c</sup>Wilcoxon

\*Abreviações: IIQ: Intervalo Interquartil e HPV: Papiloma Vírus Humano

**Tabela 9.** Hábito de sexo oral conforme gênero e local de recrutamento

Gênero/Hospital das Clínicas	Sexo oral ativo		p 0.5959 <sup>b</sup>
	Sim 16(%)	Não 2(%)	
Feminino	5 (31,25%)	1 (50%)	
Masculino	11 (68,75%)	1 (50%)	
Gênero/Hospital Paulista	Sim 18(%)	Não (9%)	p 0.6877 <sup>b</sup>
Feminino	11 (61,11%)	5 (55,56%)	
Masculino	7 (38,89%)	4 (44,44%)	

<sup>b</sup>Person

## 7 DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço associado a infecção por HPV passou a ser considerado um subgrupo com suas particularidades e opções de tratamento distintas. O câncer da orofaringe corresponde ao sítio da cabeça e pescoço com maior taxa de positividade viral e o genótipo de maior presença é o HPV 16 (100). O aumento nos casos de câncer de orofaringe nas últimas décadas tem sido observado em países desenvolvidos e em indivíduos jovens, fato esse atribuído a alterações no consumo de álcool e tabaco, além de mudanças no comportamento sexual, com o aumento do número de parceiros sexuais e prática de sexo oral (14, 101, 102). Na orofaringe, as tonsilas são a estrutura de maior incidência de câncer, com aproximadamente 23,1% dos casos provenientes dessa região, seguido por base de língua com 18,4% (103-105).

O entendimento da relação entre vírus e tecido tonsilar antes do desenvolvimento da neoplasia, possibilitaria um melhor mapeamento da prevalência na população sem câncer, bem como o direcionamento de medidas de prevenção primária e secundária contra a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de câncer em orofaringe. Desta forma, o estudo em amostras a fresco de tonsila, seria o ideal para estabelecer a real porcentagem do vírus em uma amostra da população brasileira, já que a maior parte dos estudos são realizados por coleta com escovado ou gargarejos. Uma coleta mais consistente do material poderia analisar de fato as criptas tonsilares, onde geralmente se iniciam as infecções primárias. Muitos estudos, ainda, analisam a região da boca em conjunto com a orofaringe, isso também pode alterar os resultados de prevalência da detecção do vírus (79, 81, 106-110).

A literatura em relação a prevalência de HPV em indivíduos sem câncer tem resultados discrepantes, devido a diferença nas metodologias de coleta, de detecção do DNA viral, o perfil demográfico da população e região geográfica escolhida para realizar o estudo.

No presente estudo, foi avaliada a prevalência em tonsilas de indivíduos sem suspeita de neoplasia, através da coleta de amostras a fresco provenientes de cirurgias de tonsilectomia ou uvulopalatofaringoplastia. Em nossas análises, 100% das amostras foram positivas para PCR da beta-globina, indicando boa qualidade do material submetido à PCR para identificação viral. Entretanto, a prevalência de HPV foi de 0%

tanto para a PCR usando os *primers* PGMY09/11 quanto na PCR em tempo real para o gene E7 do genótipo 16.

Em um estudo realizado por Sacramento e colaboradores no Brasil (73), para determinar a prevalência de infecção orofaríngea pelo HPV em amostras teciduais, foram recrutados 50 participantes sem câncer. Encontrou-se 14% de positividade para o DNA viral e os genótipos identificados foram 61, 16, 18 e 52. Contudo, a prevalência geral na população brasileira pode variar. De acordo com uma revisão sistemática brasileira incluindo 2060 pacientes sem câncer, tanto para infecção oral e de orofaringe, a detecção de qualquer tipo de HPV variou de 0 a 29,2%, com uma taxa de positividade combinada de 6,2%. Quando restados especificamente para o HPV16, 22 de 1551 (1,4%) indivíduos foram positivos, variando de 0 a 20,8%. A variabilidade dos resultados apresentados na revisão deve-se a diferentes métodos utilizados em diferentes estudos, como os iniciadores GP5+ / 6 + ou MY09/11 empregados na PCR convencional ou hibridização *in situ* específica para tipo viral de interesse (79).

Estudo realizado no interior de São Paulo, também com pacientes sem câncer, analisou amostras provenientes de enxague bucal de 145 indivíduos de Votuporanga - SP. A prevalência total para DNA viral foi de 2,4%, porém a análise foi tanto para enxague da cavidade oral como de gargarejo da orofaringe (110). O estudo de coorte HIM, com 1626 homens saudáveis do Brasil, México e EUA, avaliou a incidência de infecção oral por HPV por meio de enxágue e gargarejo. Os resultados do estudo mostraram que a aquisição da infecção oral por HPV em homens saudáveis é considerada um evento raro (2,5 por 1.000 pessoas / mês) quando comparado com infecções genitais (22,2 por 1.000 pessoas / mês)(81). Estes estudos reforçam nosso achado de baixa prevalência de HPV, justificando nosso resultado de 0% em 113 participantes, com uma análise exclusiva da orofaringe e em uma população de baixo risco.

Um outro ponto a ser levantado, seria a forma de coleta e o tipo de amostra analisada nos estudos de prevalência. O estudo SPLIT (*Precancerous Lesions In the Tonsils*), foi o primeiro a avaliar a prevalência de HPV em células esfoliadas, utilizando escovação nas tonsilas retiradas de cirurgias e comparando o gargarejo desses mesmos pacientes, imunocompetentes sem suspeita de neoplasia de tonsila. A porcentagem de concordância encontrada foi baixa, a prevalência de infecção por HPV obtida das escovações na tonsila foi de 3,6% e 13,1% nos gargarejos e especificamente para o HPV16, respectivamente foram de 2,2 e 4,1% (106).

Considerando ainda o tipo de amostra analisada, outro estudo desenvolvido com o objetivo de comparação de escovado e biopsia em lesões orais e de orofaringe não obteve resultado com relevância estatística, todavia o número de amostras inadequadas obtidas pela escovação sugeriu ser um método não confiável na detecção de DNA viral (111). Em nosso estudo, as amostras de tonsila foram coletadas imediatamente após retirada em centro cirúrgico, atentando-se ao cuidado de congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ , afim de manter a integridade do DNA a ser analisado no estudo.

Há muito têm sido discutidas as diferenças nas metodologias de detecção de HPV, uma vez que diversos testes, com elevada variabilidade em sensibilidade são encontrados em diferentes estudos. A metodologia realizada no presente estudo na detecção do vírus corrobora diversas pesquisas (73, 109, 112), que utilizaram extração por kit Qiagen DNeasy blood & tissue, PCR com iniciadores PGMY09/11 e confirmação da presença do DNA por beta-globina, além de utilizar PCR em tempo real para o gene E7 do genótipo 16. Em nossas análises obtivemos uma boa sensibilidade de toda a metodologia aplicada igualmente aos estudos citados, isso foi possível também confirmar em outros testes que realizamos, como a curva padrão, na análise de inibidores da PCR e na avaliação metodológica com amostras de tumores orofaríngeos nas quais, com essas 38 amostras congeladas com alta probabilidade de HPV positivo, foi possível evidenciar que nosso estudo foi realizado respeitando toda a qualidade exigida e destacando a capacidade de detecção viral da metodologia utilizada.

Adicionalmente aos dados moleculares, este estudo coletou dados de comportamentos de risco em uma população sem câncer que também podem fornecer informações norteadoras de campanhas de prevenção primária contra a infecção do HPV. Para o questionário aplicado aos indivíduos, procuramos comparar os dois hospitais participantes em relação aos hábitos de tabagismo, de etilismo e sexuais. Os participantes do Hospital Paulista são mais jovens e com maior grau de escolaridade quando comparados aos pacientes do HC. Foi demonstrada ainda uma maior carga etílica entre os participantes do HC e um baixo consumo de tabaco em pacientes de ambos os hospitais. Alguns estudos sugerem, que o tabaco pode influenciar no risco de desenvolver câncer a longo prazo em um indivíduo com status positivo para HPV, devido ao aumento da instabilidade nas respostas imunológicas ao vírus, facilitando o aumento na persistência da infecção viral (13, 100, 113).

Apesar da pouca adesão à resposta ao questionário de hábitos sexuais, foi possível observar que os participantes do HC tiveram maior quantidade de parceiros sexuais, uma

mediana de 10 parceiros no geral, além de maior quantidade de parceiros sexuais casuais, com uma mediana de 4 por participante. As causas para a recusa na resposta aos questionários, contudo, pode não ser ao acaso, com possível repercussão sobre os resultados acerca de hábitos sexuais.

Apesar de observarmos um número maior de parceiros ente pacientes que relataram infecção por HPV genital, essa diferença não foi estatisticamente significativa. O estudo de Gillison et al. (13), relacionando quantidade de parceiros e infecção pelo HPV genital nos EUA, demonstraram maior prevalência entre aqueles com mais de 20 parceiros sexuais ao longo da vida.

As diferenças observadas no perfil de escolaridade e hábitos sexuais entre pacientes recrutados nos dois hospitais, ressaltam a importância de adequada representação demográfica em estudo de prevalência do HPV na população brasileira.

Não foi possível avaliar a prática de sexo oral entre os participantes dada a taxa de resposta muito baixa, porém há diversos estudos identificando essa prática como principal fator para transmissão do HPV nos adultos (114, 115).

Existem limitações a serem consideradas neste estudo. Em primeiro lugar, apesar de realizarmos um cálculo amostral tecnicamente correto, nossa estimativa de amostra necessária foi possivelmente subestimada. Isso pode ser devido ao estudo que usamos como base para este cálculo (73), que poderia ter avaliado uma população de maior risco que a nossa ou, eventualmente, ter superestimado a prevalência.

Por fim, o baixo número de respostas ao questionário sexual, possivelmente pelo constrangimento perante o entrevistador. Muitos estudos contam com ferramentas para auto aplicação de questionários, melhorando assim a taxa de resposta a perguntas de foro íntimo.

## 8 CONCLUSÃO

- A prevalência de HPV nas tonsilas dos indivíduos sem câncer convidados a participar foi de 0%, tanto por PCR convencional quanto por PCR específico para o genótipo 16;
- A baixa resposta do questionário de hábitos sexuais e a não positividade de amostras para HPV, impossibilitou avaliar potenciais fatores de riscos associados à infecção pelo HPV.

## 9 ANEXOS

### ANEXO A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

#### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE 1: ..... DDD(.....).....

TELEFONE 2: DDD (.....) ..... TELEFONE 3: DDD (.....) .....

---

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

2. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DO HPV16 E SEU SÍTIO DE INTEGRAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX E TONSILAS”.

PESQUISADOR: DR. JOSÉ EDUARDO LEVI CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR COLABORADOR, PESQUISA E DESENVOLVIMENTO, INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, VIROLOGIA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 23.407/01-D (CRBio).

MÉDICO RESPONSÁVEL: DR. RONALDO FRIZZARINI

UNIDADE DO HCFMUSP: DISCIPLINA DE OTORRINOLARINGOLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Três anos

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Convidamos o(a) Sr(a) para participar da Pesquisa intitulada “Avaliação do perfil genético do HPV 16 e seu sítio de integração em **células epiteliais normais** e neoplásicas da cérvix e tonsilas”, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. José Eduardo Levi e do médico responsável Dr. Ronaldo Frizzarini, a qual pretende comparar características moleculares da infecção pelo vírus HPV em pacientes saudáveis (controles) e pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e do colo do útero.

- 1 – Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a utilização de **amostras normais de tonsila (amígdala sem doença)** provenientes de cirurgias de uvulopalatofaringoplastias, conhecida como "cirurgia do ronco" em adultos com transtornos do sono (com ronco e apneia) que serão identificadas para a presença do papilomavírus humano (HPV) por técnicas laboratoriais. Caso as amígdalas contenham o vírus HPV elas serão usadas como **controle normal** para a análise molecular comparadas com amostras de câncer de cabeça e pescoço (orofaringe);
- 2 – O procedimento para a obtenção das amígdalas não será diferente do rotineiro, pois as amígdalas são sempre retiradas para a realização da cirurgia do ronco. Este estudo não irá testar exames ou cirurgias novas. A cirurgia do ronco que você irá realizar será idêntica as cirurgias realizadas normalmente. Faz parte da cirurgia do ronco a retirada da amígdala e ao participar do estudo você autoriza que essa amígdala seja enviada para análises, ao invés delas serem desprezadas. As amostras serão armazenadas em freezers específicos para análises posteriores, que compreendem a extração do material genético e genotipagem de HPV 16 específico. Caso as amostras sejam positivas, será realizada a análise molecular do vírus;
- 3 – Procedimentos pré-operatórios serão realizados para avaliar suas condições clínicas para realizar a cirurgia com segurança. Esses exames serão solicitados pelo médico que irá realizar a cirurgia e normalmente incluem: Hemograma completo – permite avaliar se a paciente possui anemia, se a contagem de plaquetas, que auxiliam na contenção do sangramento está normal, e se o número e divisão percentual das células de defesa estão normais; Coagulograma – permite avaliar a qualidade da coagulação, necessária para controlar os sangramentos; Bioquímica: glicose, sódio, potássio, creatinina, uréia – detecção de sinais de diabetes, alterações do metabolismo, assim como da função renal;



- 4 – Os cuidados pós-operatórios são idênticos aos das cirurgias realizadas rotineiramente e você deverá seguir as orientações dadas pelo médico que realizou a sua cirurgia;
- 5 – Não há benefícios ou vantagens extras para o participante do estudo. Porém, como este estudo irá avaliar se o vírus HPV facilita o aparecimento de câncer de boca, sua participação poderá colaborar futuramente na identificação e prevenção desse tipo de tumor na população;
- 6 – A opção pelo tratamento cirúrgico, ao invés de outras formas de tratamento, foi decidida pela junta médica do ambulatório da otorrinolaringologia. Caso você decida não participar do estudo seu tratamento não mudará em nada;
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **José Eduardo Levi**, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 2º andar, CEP 05403-000 - Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, e-mail [dudilevi@usp.br](mailto:dudilevi@usp.br) Telefone(s) 11 3061-8666. O médico otorrinolaringologista responsável é o Dr Ronaldo Frizzarini, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, 6º andar – Divisão de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, e-mail [ronaldo.frizzarini@hc.fm.usp.br](mailto:ronaldo.frizzarini@hc.fm.usp.br) Telefone(s) 11 2661-6288. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: [cappesq@hcnnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnnet.usp.br);
- 8 – Mesmo que você tenha concordado em participar do estudo, você pode desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Você terá direito de saber dos resultados deste estudo a qualquer momento, devendo contatar os pesquisadores responsáveis;
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;
- 12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Esse material biológico coletado ficará disponível para a retirada do sujeito de pesquisa, caso seja de seu interesse, ou, alternativamente, as amostras poderão ser

destruídas de acordo com as normas de biossegurança vigentes no departamento de virologia da instituição em questão, de acordo com a resolução do CNS 441, de 12 de maio de 2011.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DO HPV16 E SEU SÍTIO DE INTEGRAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX E TONSILAS”.

Eu discuti com o **Dr. Ronaldo Frizzarini** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Assinatura do paciente/representante legal      Data    /    /   

---

Assinatura da testemunha      Data    /    /   

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

---

\_\_\_\_\_ Data    /    /   

Assinatura do responsável pelo estudo

## ANEXO B – Parecer Consubstanciado da CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DO HPV16 E SEU SÍTIOS DE INTEGRAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DA CÉRVIX E TONSILAS

**Pesquisador:** JOSÉ EDUARDO LEVI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 01353812.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 173.181

**Data da Relatoria:** 05/12/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se do segundo relato do projeto de pesquisa acima especificado.

O papilomavírus humano (HPV) constitui o principal agente etiológico de alguns tipos de tumores humanos, responsável pelo desenvolvimento de quase 100% dos tumores de colo uterino, e 25% dos carcinomas de cabeça e pescoço. Os carcinomas de colo uterino apresentam a terceira maior incidência global de câncer em mulheres. Os carcinomas de cabeça e pescoço (CCP) representam um grupo heterogêneo de tumores agrupados devido a sua localização anatômica. Acometem mais frequentemente homens com idade superior a 50 anos e histórico de tabagismo e etilismo crônicos. Dentre os HPV de alto risco, o HPV16 é o tipo mais detectado nos tumores de orofaringe, (90 a 95%), e em mais de 50% dos casos de carcinoma de colo uterino. Em infecções persistentes, o genoma do HPV permanece na forma epissomal, isto é, não integrado ao genoma humano. No entanto, na maioria das lesões cancerígenas, o DNA de HPV de

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-6442 **Fax:** (11)2661-6442 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



alto risco

é frequentemente quebrado e integrado ao genoma da célula hospedeira, alterando a expressão dos genes virais e de genes do hospedeiro. Os principais genes expressos pelos vírus são as oncoproteínas E6 e E7, necessárias para a replicação viral, estimulando a proliferação e atuando na transformação maligna e na manutenção dos tumores. A integração pode levar tanto a ativação, quanto a inativação de genes celulares envolvidos no processo tumoral. As alterações genéticas quase sempre ocorrem como resultado à exposição excessiva ao tabaco, álcool e outros elementos carcinogênicos que desencadeiam danos irreversíveis ao DNA, ocasionando alterações nas regiões codificadoras e regulatórias de genes supressores tumorais e oncogenes. O acúmulo destas mutações possibilita que as células adquiram características tumorais, incluindo resistência à morte programada (apoptose), adquirindo características de proliferação descontrolada. Tendo em vista que o HPV16 é o principal agente etiológico de carcinomas de colo uterino, e também de uma parte dos tumores de orofaringe, principalmente de tonsilas palatinas, os mecanismos que regulam o tropismo desses HPV por este tipo de epitélio ainda não foram elucidados. Sendo assim, tentativas de se identificar regiões susceptíveis à integração viral, permitindo uma maior compreensão do processo de transformação causado por HPV são bem vindas. Este projeto tem como objetivo identificar, a partir do sequenciamento do genoma completo do vírus, padrões moleculares capazes de responder pelo tropismo diferencial apresentado por cepas de HPV16 e do curso assintomático ou transformante da infecção pelo HPV16 nos mesmos sítios. Além disso, avaliar a diversidade genética do HPV16 nos tumores de colo uterino e de orofaringe, e analisar os sítios de integração viral no genoma humano, para verificar se há uma região preferencial para a inserção do HPV em cada tumor. Vários relatos na literatura indicam que o prognóstico dos pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos é melhor do que dos casos HPV negativos, independentemente do

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-6442

**Fax:** (11)2661-6442

**E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



- 4) Comparar a estrutura molecular do vírus HPV16 em 30 amostras de carcinomas epidermóides cervicais, relacionando com as sequências de 10 amostras normais de cérvix uterina com infecção do vírus HPV16;
- 5) Comparar a estrutura molecular do vírus HPV16 em 30 amostras de carcinomas epidermóide de orofaringe, relacionando com as sequências de 10 amostras normais de orofaringe com infecção do vírus HPV16;
- 6) Sequenciar o genoma completo do vírus nos dois grupos amostrais, a fim de identificar alterações específicas características dos vírus infectantes nos tumores de orofaringe e cérvix uterina;
- 7) Sequenciar as regiões do genoma humano que flanqueiam os sítios de integração do HPV16, em ambos os grupos, para verificar se há regiões preferenciais de inserção viral;
- 8) Realizar análise filogenética das sequências do vírus HPV16 e comparar com os dados clínicos dos pacientes envolvidos no estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Aparentemente, não existem riscos suplementares aos sujeitos da pesquisa pelo fato das amostras a serem analisadas fazerem parte de protocolo assistencial tanto das mulheres seguidas no Departamento de Ginecologia, quanto dos indivíduos portadores de neoplasias de cabeça e pescoço. O risco dos procedimentos foi considerado baixo, entretanto é preciso ter certeza que não existe aumento de risco para os grupos controle.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa que lida com tema importante e que pretende usar metodologia laboratorial molecular de ponta.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

No primeiro relato foram sugeridas as seguintes alterações:

- adequação do TCLE (linguagem, destino das amostras e garantias dos sujeitos de pesquisa), e elaboração do TCLE do grupo controle: pendência atendida. A linguagem, apesar de ainda poder

**Endereço:** Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-6442 **Fax:** (11)2661-6442 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



ser simplificada, é agora compreensível aos sujeitos de pesquisa.

- solicitação de dispensa da aplicação de novo TCLE para uso das amostras da Ginecologia (tanto grupo de estudo quanto grupo controle): pendência atendida.

- adequação do orçamento da pesquisa (R\$35.000,00 ou R\$111.176,42 ?): na nova versão consta o valor de R\$111.176,42. Pendência atendida.

- anexar a aprovação da pesquisa pelo Departamento de Otorrinolaringologia. Foram anexadas as aprovações de vários departamentos, todos parceiros na pesquisa (Ginecologia, Otorrinolaringologia). Pendência atendida.

Além disso, foram anexadas as aprovações do projeto mãe, ao qual a pesquisa atual encontra-se atrelada. Trata-se de pesquisa aprovada pela CONEP em 2 de março de 2012 e explicitada abaixo.

PARECER Nº. 128/2012

Registro CONEP 16491 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto: 405501 Processo nº 25000.084206/2011-76

Projeto de Pesquisa: "Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço" (GENCAPO Fase II).

Pesquisador Responsável: Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto/SP (1º CENTRO)

CEP de origem: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP)

Área Temática Especial: Genética Humana, Biossegurança, Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Patrocinador: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

**Recomendações:**

Não existem outras recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não existem outras pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-6442 **Fax:** (11)2661-6442 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Sem pendências.

SAO PAULO, 14 de Dezembro de 2012

Assinador por:  
Luiz Eugênio Garcez Leme  
(Coordenador)

## ANEXO C – Questionário Inicial de Hábitos e Estilo de vida - GENCAPO

Fevereiro, 2012

ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE CÂNCER DE BOCA, FARINGE E LARINGE	
Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida	
Nome do paciente.....	.....
Endereço de contato:.....	.....
Telefone.....	E-mail .....
Endereço de algum parente ou amigo para contato:.....	.....
.....	Telefone:.....

**Pré-entrevista**1. Paciente realizou tratamento prévio para o câncer em outro centro?  (1)Sim (2)Não

2. Se sim, qual tratamento foi realizado? |\_|\_|\_|\_|

(1) cirurgia (2) radioterapia (3) quimioterapia (4) traqueostomia (5) outro especifique.....

**ATENÇÃO:** Caso o paciente já tenha realizado qualquer tratamento (exceto traqueostomia) em outro centro, ele não deverá obter ID e nem participar do estudo. Seu nome e idade deverão constar apenas na folha de casos não-participantes. Caso o paciente não tenha realizado tratamento prévio em outro centro ou tenha realizado apenas traqueostomia, continue a entrevista.

A1 Status (1) Caso; (2) Controle Hospitalar (Enfermaria); (3) Controle Visitante ; (4) Controle populacional 

Prontuário médico No. ....

A2 Nome: .....

A3 Nome da mãe: .....

A4 Hospital |\_|\_|

A5 Principal razão para a admissão no hospital (diagnóstico principal) |\_|\_|\_|-|\_|\_| CID-10

(para pacientes admitidos em ambulatório, somente com suspeita de câncer = 8888)

A6 Data da admissão no hospital (ou visita) |\_|\_|-|\_|-|\_|\_|\_|\_|\_|\_|  
Dia Mês Ano

A7 Entrevistador .....

**Parte B – INFORMAÇÕES GERAIS**B1 Data da entrevista |\_|\_|-|\_|-|\_|\_|\_|\_|\_|\_|  
Dia Mês Ano

B2 Início da entrevista |\_|\_|h |\_|\_|min

B4 Sexo (1) Masculino (2) Feminino 

B5 Qual a sua idade? |\_|\_|

B6 Qual a sua data de nascimento? |\_|\_|-|\_|-|\_|\_|\_|\_|\_|\_|  
Dia Mês AnoB6.1 Você nasceu de parto natural ou de parto cesárea? (1) Natural (2) Cesárea (9) Não sei 

B7 Em que cidade ou distrito você mora? (usar os primeiro dígitos do CEP) |\_|\_|\_|\_|

B8 Há quantos anos você vive nesse lugar? |\_|\_| (se há menos de 1 ano codifique como 00)

B9 Se você mora nesse lugar há menos de um ano, onde você morava antes? .....

B10 Você já freqüentou a escola? (1) Sim (2) Não B11 Qual o seu grau de escolaridade?  (0) Analfabeto (1) Alfabetizado sem frequentar a escola (2) Ensino Fundamental Incompleto (3) Ensino Fundamental Completo (terminou a 8ªsérie) (4) Ensino Médio Completo (terminou o 3o colegial) (5) Ensino Superior Completo

ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

B12 Qual a sua raça? (cor da pele)  (1) Branco (2) Negro (3) Pardo ou Mulato (4) Amarelo (Asiático) (5) Indígena

B13 Qual a sua profissão? (aquela que o(a) sr.(a) exerceu por mais tempo) .....

B13.1 Se aposentado, qual a sua profissão antes de se aposentar? .....

B13.2 Se dona de casa ou "do lar", qual a profissão do chefe da família? .....

**Parte C – HÁBITO DE FUMAR**C1 Você fuma ou já fumou em média um cigarro, um charuto ou um cachimbo regularmente, durante pelo menos 1 ano? 

(1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão C4]

Se Sim ou somente no passado, verificar no manual do entrevistador como preencher o quadro abaixo.

Gostaríamos que o(a) Sr.(a) descrevesse os períodos de sua vida em que fumou cigarro, charuto ou cachimbo, as quantidades que fumou e outros detalhes.

Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto à quantidade e tipo de cigarro.

Ignore as mudanças que ocorreram por períodos curtos (menos de 1 ano).

**Nota para o entrevistador:** Evite a superposição de anos para consumo do mesmo tipo de cigarro, por exemplo: utilize 30-40, 41-45 ao invés de 30-40, 40-45.OBS: Seguem as opções de preenchimento :**Tipo de Tabaco : 1-** Cigarro; **2-** Charuto; **3-** Cachimbo; **4-** Cigarro de palha**QUADRO T1**

Tipo de Tabaco	Idade de Início	Idade que parou	Nº por Dia

Somente para ex-fumantes

C2 Idade em que parou de fumar? |\_|\_|

C3 Você parou de fumar por que estava doente? (1) Sim (2) Não **AS QUESTÕES C4 A C8 SÃO APENAS PARA NÃO FUMANTES**C4 Você esteve casado (a) (ou vivendo junto) com um(a) fumante? (1) Sim (2) Não  [Se 'Não' vá para C6]

C5 Descreva o hábito do fumo de seu (sua) esposo(a) na sua presença:

**QUADRO T2**

Sua idade quando esposo(a) iniciou	Sua idade quando esposo(a) parou	Número de horas/dia que estava exposto	Número de horas que fumava em sua presença	
			Durante a semana	Fim de semana

C6 Você trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?  (1) Sim (2) Não [Se 'Não' vá para C8]

C7 Descreva os períodos durante os quais você trabalhou com fumantes:

**QUADRO T3**

Idade em que começou	Idade em que parou	Número de horas/dia que estava exposto	Nº de horas que fumavam em sua presença

C8 Quando criança, seu pai ou sua mãe fumavam?  (1) Sim (2) Não (9) Não lembra



ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

## Maconha

C9 Você fuma ou já fumou maconha regularmente durante pelo menos 6 meses?  (1) Sim (2) Não  
[Se 'Não' vá para a parte D]

C10 Quantos cigarros de maconha você fuma(fumava) por semana

C11 Idade em que começou a fumar maconha

C12 Idade em que parou de fumar maconha

**Parte D – HÁBITOS ALIMENTARES E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS**

D. Antes de você ficar doente, com qual frequência você consumia os seguintes alimentos e bebidas?

1 – Nunca 2- Menos de 1 vez/mês 3- 1,3 vezes/mês 4- 1 ou 2 vezes/semana 5- maioria dos dias 6- todos os dias

D1 De maneira geral, com qual frequência você come legumes e verduras (excluindo batatas)?

D2 Folhas verdes cruas e vegetais  D3 Brócolis, Repolho, Couve  D4 Cenoura

D5 De maneira geral, com qual frequência você come frutas frescas? (incluindo salada de frutas e suco de frutas [natural])

D6 Suco de frutas (natural)  D7 Maçãs ou peras  D8 Frutas cítricas (laranja, limão, mexerica)

D9 Tomates frescos  D10 Bananas  D11 Carne Vermelha

D12 Você ingere ou já ingeriu café?  (1) Sim (2) Somente no passado (3) Não, nunca (Se "não, nunca", ir para D13)

Para pessoas que consomem café atualmente ou já consumiram no passado

Descreva os períodos de sua vida durante os quais tomou (toma) café. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade e tipo de café. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante curtos períodos de tempo (menos de 1 ano).

**NOTA PARA O ENTREVISTADOR:** Evite a superposição de anos de consumo de uma mesma bebida, por exemplo: utilize 30- 40,41-45 ao invés de 30-40,40-45. Perguntar separadamente para cada bebida.

OBS: Segue as opções de preenchimento :

**Café :** 1- Coadado; 2- Expresso; 3- Descafeinado.

**Unidade:** 1- Copo pequeno -50ml; 2- Copo médio -100ml; 3- Copo grande -250ml;  
4- 1/2 garrafa - 330ml; 5- Garrafa 700-750ml; 6- Garrafa - 1L

**Por :** 1- Dia; 2- Semana; 3- Mês.

**QUADRO T4**

Café	Idade de Início	Idade que parou	Unidade	Unidades Consumidas	Por

D13 Se você se lembra, pode por favor me dizer qual era o seu peso dois anos atrás?  kg

D14 Qual era o seu peso quando você tinha 30 anos? ?  kg

D15 Qual é o seu peso atual? ?  kg

D16 Qual é a sua altura?  cm

**Parte E – CONSUMO DE BEBIDAS (ÁLCOOL E CHIMARRÃO)**

E1 Você ingere ou já ingeriu bebidas alcoólicas? (1) Sim (2) Somente no passado (3) Não, nunca (Se não, vá para questão E7)

E2 Quantas vezes por semana você consome ou consumia bebidas alcoólicas? (0 – 7)

E3 Quantas vezes por semana você consumiu bebidas alcoólicas antes do meio-dia? (0 -7)

Para pessoas que consomem bebidas alcoólicas atualmente ou já consumiram no passado

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) tomou bebidas alcoólicas.

Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade e tipo de bebida.

ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

**NOTA PARA O ENTREVISTADOR:** Evite a superposição de anos de consumo de uma mesma bebida, por exemplo: utilize 30-40,41-45 ao invés de 30-40,40-45. Perguntar separadamente para cada bebida.

OBS. Destilados: uísque, conhaque, cachaça e vodca.

OBS: Segue as opções de preenchimento : **Bebida** : 1- Vinho; 2- Cerveja; 3- Destilados

**Unidade:** 1- Copo pequeno -50ml; 2- Copo médio -100ml; 3- Copo grande -250ml 4- 330ml; 5-Garrafa 700-750ml;

**6-Garrafa - 1L Por :** 1- Dia; 2-Semana; 3- Mês

Quadro T5

Bebida	Idade de Início	Idade que Parou	Unidade	Unidades Consumidas	Por

E4 Qual foi a maior quantidade de cachaça que você já bebeu em um único dia?  garrafas

**Se você somente consumia bebidas alcoólicas no passado:**

E5 Há quantos anos parou de beber? |\_|\_|

E6 Você parou de beber porque estava doente?  (1) Sim (2) Não

E7 Mate (Chimarrão)

Você bebe ou já bebeu chimarrão?  (1) Sim, ainda bebe (2) Somente no passado (3) Nunca  
[se 'Nunca' vá para a questão F1]

E8 Qual é o seu consumo médio diário de chimarrão? |\_|\_|\_|\_| mililitros

E9 Em qual temperatura você normalmente bebe ou bebia o chimarrão?  (1) Frio (2) Morno (3) Quente (4) Muito quente

#### Parte F - SAÚDE BUCAL

F1 Com qual frequência você escova seus dentes?

(0) Nunca

(1) < uma vez por semana

(2) 1-2 vezes por semana

(3) Dia sim, dia não

(4) Uma vez por dia

(5) 2 vezes/dia

(6) 3 vezes/dia

(7) > 3 vezes/dia

(8) Edêntulo (não tem dentes) [vá para a questão F5]

F2 Você usa fio dental? (1) Não (2) Sim, às vezes (3) Sim, sempre

F3 Que material você usa para escovar os dentes? (1) nenhum (2) Creme dental (3) Outro .....

F4 Suas gengivas sangram quando você escova os dentes? (1) Não (2) Às vezes (3) Sempre ou quase sempre

F5 Com qual frequência você usa enxaguatórios bucais? (0) Nunca (1) < uma vez por semana (2) 1-2 vezes por semana (3) Dia sim, dia não (4) Uma vez por dia (5) 2 vezes/dia (6) 3 vezes/dia (7) >3 vezes/dia

F6 Você usa próteses removíveis? (dentadura, ponte móvel) (1) Sim (2) Não  (Se não, vá para questão F9)

F7 É uma prótese total? (dentadura) (1) Sim (2) Não

F8 Com qual idade você começou a usar dentaduras? |\_|\_|

F9 Nos últimos 20 anos, com qual frequência você foi ao dentista?  (1) Todos os anos (2) A cada 2-5 anos (3) A cada 6 anos ou raramente (4) Nunca

ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

**Parte G- HISTÓRICO DE CÂNCER NA FAMÍLIA**

G1 Quantos irmãos, irmãs, filhos ou filhas você tem? Irmãos |\_|\_|\_| Filhos |\_|\_|\_|

G2 Algum dos seus filhos, irmãos ou pais já tiveram câncer? (1) Sim (2) Não |\_|

**Tipo de familiar :** 1- Próprio(a) Paciente; 2- Mãe; 3- Pai; 4- Irmão; 5- Irmã; 6- Filho; 7- Filha  
**Tabagismo :** S- Sim; N- Não; I- IGN

**QUADRO T6**

Tipo de familiar	Tipo de tumor	Idade no diagnóstico	Tabagista

**Parte H- DIABETES MELLITUS**

H1 Alguma vez você já foi diagnosticado com diabetes? |\_| (1) Sim (2) Não [Se 'Não' vá para a questão I1]

H2 Lembra qual foi o mês e ano de diagnóstico? |\_|\_|-|\_|\_| Mês/Ano

H3 Sabe qual o tipo de diabetes (1 ou 2)? |\_| (1) Tipo 1 (2) Tipo 2 (3) Não sabe

H4 Você utiliza medicamento(s) para controlar o diabetes? |\_| (1) Sim (2) Não [Se 'Não' vá para a questão I1]  
Qual (is)?

H5 Hipoglicemiantes orais: (1) Sim (2) Não (3) Não sabe |\_|

H6 Insulina: (1) Sim (2) Não (3) Não sabe |\_|

**Parte I – EXAME REALIZADO PELO ENTREVISTADOR**Medidas Antropométricas

I1 Peso (Kg) |\_|\_|\_|

I2 Altura (cm) |\_|\_|\_|

Exame oralI3 Condição geral de higiene bucal (ex: tártaro, placa bacteriana, sangramento gengival, etc) |\_| (1) Boa (2) Razoável  
(3) Ruim/Péssima

I4 Dentes ausentes |\_| (1) Menos do que 5 (2) 6-15 (3) 16 ou mais

**Parte J – MATERIAL BIOLÓGICO**

J1 Há quando tempo você fez sua última refeição? |\_|\_|h-|\_|\_|min

J2 Foi coletado sangue? |\_| (1) Sim (2) Não

J3 Foi coletado um espécime de tumor fresco? |\_| (1) Sim (2) Não

**(Parte K – hábitos sexuais)**

**ATENÇÃO:** As próximas perguntas versam sobre assuntos íntimos do paciente. Sendo assim, a entrevista deverá continuar **APENAS se:** - O paciente estiver sozinho com o entrevistador ou, estando acompanhado de familiar, amigo, ou profissional de saúde, este puder se retirar do local da entrevista durante as próximas perguntas; O paciente estiver apto a responder às perguntas sem auxílio de acompanhante.

**Parte K – HISTÓRICO DE HÁBITOS SEXUAIS**

As próximas perguntas são íntimas e referem-se a doenças sexualmente transmissíveis e hábitos sexuais. Essas informações importantes para o estudo de alguns eventos em saúde. Lembre-se, suas respostas são confidenciais e usadas apenas para fins de pesquisa.

ID No. BR-|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

K1 Você já teve alguma doença sexualmente transmissível, diagnosticada por um médico ou profissional de saúde?   
 (1) Sim (2) Não (8) Não sei (9) Não quero responder

K1.1 Se sim, qual(is)? (para cada doença, utilizar o código: (1) Sim (2) Não (3) Não sei )

(1) Verrugas genitais  (6)NGu- Uretrite não gonocócica   
 (2) Herpes genital  (7)Hepatite B   
 (3)Clamídiase  (8) Hepatite C   
 (4) Gonorréia  (9) HIV   
 (5) Sífilis  (10) HPV

K2 Em toda sua vida, você já teve relação sexual (vaginal, ou oral, ou anal) com alguém?

(1) Sim (2) Não (9) Não quer responder

K3 Em toda sua vida, com quantas pessoas você teve relação sexual? |\_|\_|\_|\_|

K3.1 Se difícil de responder  (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) mais de 100 (9) não quer responder

K4 Você tem um(a) parceiro(a) sexual regular, ou seja, com quem mantenha relações sexuais regularmente?

(1) Sim (2) Não (9) Não quer responder

K5 No total, quantos parceiros **REGULARES** você já teve? |\_|\_|\_|\_|

K5.1 Se difícil de responder (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) mais de 100 (9) não quer responder

K6 No total, quantos parceiros **CASUAIS** você já teve? |\_|\_|\_|\_|

K6.1 Se difícil de responder (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) mais de 100 (9) não quer responder

K7 Destes(as) parceiros(as) sexuais, quantos você pagou ou recebeu dinheiro ou droga para fazer sexo?

( caso a resposta seja "nenhum", preencha com "0") |\_|\_|\_|\_|

K7.1 Se difícil de responder (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) mais de 100 (9) não quer responder

K8 Você já fez sexo colocando sua boca nos genitais do(a) parceiro(a) (sexo oral ativo)?

(1) Sim (2) Não (9) Não quer responder [Se 'Não', vá pra J12]

K9 Quantos anos você tinha quando fez sexo oral em alguém pela primeira vez? |\_|\_|\_| anos

[Anotar "99" caso o paciente não queira ou não saiba responder]

K10 Há quanto tempo você fez sexo oral em alguém pela última vez? |\_|\_|\_| anos

[Anotar "0" caso o paciente tenha feito sexo oral há menos de um ano; Anotar "99" caso o paciente não queira ou não saiba responder]

K11 Com que frequência você faz ou fazia sexo oral no(a) parceiro(a)? (preencher uma das três linhas abaixo com um número, de acordo com a frequência que o paciente responder, ex: 1 vez por mês)

.....vezes por semana ou

.....vezes por mês ou

.....vezes por ano

(9) Não quer responder

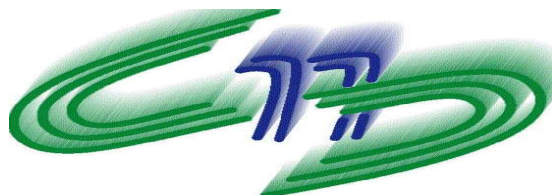
K12 Qual era o sexo das pessoas em quem você fez sexo oral?  (1) mulheres (2) homens (3) homens e mulheres (9) Não quer responder

K13 Você já fez sexo colocando sua boca no ânus do(a) parceiro(a)?  (1) Sim (2) Não (9) Não quer responder

K14 Você já fez sexo colocando seus genitais na boca do(a) parceiro(a) (sexo oral passivo)?  (1) Sim (2) Não (9) Não quer responder

B3 Término da entrevista |\_|\_|\_|h |\_|\_|\_|min

Sua contribuição foi muito importante para o nosso estudo. Você está ajudando a planejar melhor o cuidado à saúde da comunidade. Muito obrigado(a) por sua cooperação!

**ANEXO D – Parecer Consubstanciado GENCAPO****COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER Nº. 128/2012**

**Registro CONEP 16491** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Folha de Rosto: 405501 Processo nº 25000.084206/2011-76 Projeto de Pesquisa:** *"Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço"* (GENCAPO Fase II). **Pesquisador Responsável:** Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva **Instituição:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP (**1º CENTRO**) **CEP de origem:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP) **Área Temática Especial:** Genética Humana, Biossegurança, Pesquisa com Cooperação Estrangeira **Patrocinador:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

**Sumário geral do protocolo**

Sob a denominação de câncer de cabeça e pescoço incluem-se as neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe, sendo a maioria do tipo histológico espinocelular. Mundialmente, constitui o sexto tipo de câncer mais comum, compreendendo cerca de 6% dentre todos os tipos de câncer. Acima de 500.000 casos novos e cerca de 300.000 óbitos por tumores de cabeça e pescoço são estimados por ano. No Brasil, mais de 14 mil casos novos são estimados para 2010, considerando apenas os tumores de cavidade oral, e as taxas de incidência previstas correspondem a 22,1 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

Os principais fatores de risco para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas. Existem evidências de um aumento de risco para os fumantes da ordem de três a quatro vezes para o câncer da cavidade oral e faringe e de dez vezes para o câncer de laringe. O risco conferido pelo álcool também é significativo -o consumo de 50 gramas por dia traduz-se em aumento de aproximadamente três vezes quanto ao risco de câncer de cavidade oral e faringe e de cerca de duas vezes para o risco de câncer de laringe. Juntos, tabaco e álcool são responsáveis por aproximadamente 51% dos tumores de cabeça e pescoço nos Estados Unidos da América, 84% na Europa e 83% na América Latina. O impacto do efeito combinado de tabaco (cigarros/dia) e álcool (bebidas/semana) é maior que a soma dos seus efeitos individuais e excede um efeito multiplicador sobre o risco de câncer de cabeça e pescoço.

Outros fatores de risco para esses tumores incluem a ingestão de mate quente

(chimarrão), baixa ingestão de frutas e vegetais e infecção por HPV. Várias circunstâncias profissionais e exposição a carcinógenos nos locais de trabalho, tais como manufatura de isopropanol e exposição a névoas contendo ácido sulfúrico e gás mostarda, são fatores de risco suspeitos para o câncer de laringe. Outros possíveis fatores de risco incluem tabagismo involuntário, histórico sexual, uso de maconha, má higiene bucal, história familiar de câncer de cabeça e pescoço, baixo status socioeconômico e baixo índice de massa corporal.

O CECP é uma das neoplasias mais frequentes no Brasil. Seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevida em cinco anos é baixa. São poucos os estudos de cunho etiológico no Brasil com tamanhos de amostra suficientemente grandes para avaliar simultaneamente múltiplos fatores de risco para o CECP e que permitam estratificações agregando casos e controles para análises específicas. Ou seja, estudos em grande escala, de seguimento de pacientes com CECP, que permitam avaliar simultaneamente o papel do HPV, fatores ambientais, clínicos, histopatológicos, moleculares e a terapêutica utilizada na sobrevida de pacientes e no desenvolvimento do tumor primário não estão disponíveis no Brasil.

Segundo os proponentes, a organização de uma coorte de pacientes com seguimento apropriado após o diagnóstico (com entrevistas periódicas e coleta de sangue) permitirá uma abordagem única para avaliação do papel dos fatores relacionados aos hábitos de vida sobre o prognóstico da doença e a ocorrência de segundo câncer primário, ajudando a identificar marcadores precoces de recrudescimento e outros eventos mórbidos.

A variação geográfica na associação entre HPV e risco de CECP, bem como o papel do HPV na sobrevida de pacientes, devem ser investigados. A organização proposta no projeto em tela no âmbito do Estado de São Paulo e sua ampliação para outras regiões do país, no contexto do projeto InterCHANGE, permitirá tais avaliações.

A estimativa da probabilidade de sucesso de tratamento, complicações e morbidade é essencial para tomadas de decisão clínica e para o aconselhamento de pacientes com CECP. Entretanto, existem poucas opções para cálculo dessa estimativa e

o método mais frequentemente utilizado tem como base a experiência, objetiva e subjetiva, do médico. Uma alternativa constitui a probabilidade média de desfechos, mas que não considera as características individuais e não permite avaliação personalizada. Tratamentos mais agressivos são propostos para casos de alto risco, embora os limites entre os níveis de risco não sejam nítidos atualmente. Existe, portanto, a necessidade de definir mais claramente tais limites.

**Objetivos:** O presente projeto tem como objetivo geral identificar fatores ligados ao estilo de vida, infecção por HPV, bem como perfis de expressão gênica (tanto miRNAs quanto mRNAs) por sequenciamento em larga escala, fatores clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao comportamento biológico de CECP e, após integração dos dados obtidos, desenvolver uma ferramenta preditiva para a determinação do risco individual de eventos mórbidos em portadores desses tumores, incluindo metástases linfonodais e hematogênicas, sobrevida geral e livre de doença e ocorrência de segundos tumores primários.

Com base no objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos: Realizar o recrutamento de uma grande série de pacientes com CECP e seus controles, que permita estratificações detalhadas das questões de estudo e garanta resultados precisos e robustos; Avaliar os fatores etiológicos e prognósticos do CECP por meio de informações obtidas por questionário sucinto sobre estilo de vida, tratamento e evolução da doença, aplicado no momento do diagnóstico e em retornos anuais dos pacientes; Avaliar histologicamente amostras de CECP com relação à margem de invasão, infiltração linfática, vascular e neural, relacionando com

marcadores biológicos de apoptose, proliferação, hipóxia, potencial metastático, entre outros; Identificar e caracterizar padrões de metilação do DNA associados a eventos mórbidos e/ou progressão tumoral de CECP, em genes que exibiram, em estudos prévios do grupo, alterações epigenéticas ou expressão reduzida e ilhas CpG nas sequências regulatórias; Analisar o transcrito de cabeça e pescoço empregando tecnologia de sequenciamento em larga escala para identificar eventos transcricionais associados ao fenótipo de CECP com potencial de predição do risco de eventos mórbidos, transcritos de função desconhecida ou resultantes de fusões e deleções gênicas, isoformas alternativas e polimorfismos ou mutações nos transcritos sequenciados; Sequenciar pequenos RNAs, em particular microRNAs, de amostras de CECP e suas respectivas margens cirúrgicas para identificação de marcadores candidatos com potencial de utilização na análise de plasma, para acompanhamento clínico e/ou avaliação de prognóstico; Analisar o metaboloma e o perfil proteico de carcinomas de cabeça e pescoço, especificamente a fração glicosilada da membrana celular, e identificar eventos relacionados com características clínicas e histopatológicas e com potencial de predição do risco de eventos mórbidos; Investigar o papel de marcadores candidatos na tumorigênese, utilizando estudos funcionais *in vitro*, e o seu potencial de utilização em abordagens pouco invasivas, validando transcritos e proteínas diferencialmente expressas no plasma e em tecidos de pacientes; Realizar revisão sistemática da literatura sobre biomarcadores de CECP relacionados a eventos mórbidos e extrair um resumo quantitativo de dados publicados, potencialmente úteis para predição de risco individual; e Desenvolver e validar ferramenta de predição do risco individual de eventos mórbidos em pacientes com CECP, considerando dados de exposição a agentes ambientais e vírus, e características clínicas, histopatológicas e moleculares desses tumores.

**Métodos:** Cada centro clínico recrutará uma série de casos de CECP, incluindo tumores da cavidade oral, orofaringe e laringe. Um grupo comparável de controles será recrutado ao mesmo tempo, pareados por frequência com os casos por sexo, faixa etária (5 anos), etnia e área de residência. Os controles hospitalares serão escolhidos de uma lista restrita de doenças e controles visitantes ao hospital também serão aceitáveis. A entrevista de casos e controles será feita por entrevistador treinado por meio de questionário estruturado para obtenção de informações atuais e passadas sobre tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares e outros fatores de estilo de vida.

### **Local de realização**

Trata-se de um estudo nacional, multicêntrico, com cooperação estrangeira.

As amostras e dados dos pacientes e controles serão coletados nos seguintes cinco centros clínicos: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Hospital Heliópolis, Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital do Câncer de Barretos e Faculdade de Medicina do ABC. O Grupo de Pesquisas Epidemiológicas em Câncer (GPEC) da Faculdade de Saúde Pública da USP será o centro receptor dos questionários e informações sobre material biológico. O material biológico será processado e armazenado em diferentes centros; os procedimentos de armazenamento para manutenção da qualidade do material biológico serão gerenciados pelo Departamento de Biologia Molecular da FAMERP/SP. Pelo menos metade das amostras de cada indivíduo deverá ser transportada para o biorepositório central (local a ser decidido), após a aprovação dos comitês de ética em cada local (centro). As análises do material biológico serão realizadas nos laboratórios dos pesquisadores principais e associados (listados acima), excetuando a análise de anticorpos para proteínas do HPV, para a qual será contratado o Centro de Pesquisa em Câncer da Alemanha, em Heidelberg, sob supervisão do Dr. Michael Pawlita. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC/WHO),

nas pessoas de Maria Paula Curado e Paul Brennan, dará apoio logístico futuro ao projeto na sua integração à rede de centros de pesquisa no Brasil e à rede internacional de pesquisa sobre CECP e participará das análises dos dados epidemiológicos (Anexo “Declaração CONEP”).

### **Apresentação do protocolo**

O protocolo foi encaminhado por ofício, acompanhado de duas mídias digitais idênticas, contendo os seguintes documentos: Sumário; Projeto Comitê de Ética SIRP, Pasta de Anexos com: Aprovação do “Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço -INTERCHANGE -BRASIL (Projeto nr. 09-33) pelo Comitê de Revisão Institucional da IARC, Folha de rosto, Declaração de Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP/SP, Cronograma de Execução, Orçamento Financeiro, Lista de Centros Participantes, Parecer consubstanciado de pendências, Resposta às pendências solicitadas pelo CEP, Parecer consubstanciado de aprovação, Endereço do Currículo Lattes/CNPq, Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida, Formulário de Informações Clínicas (somente para os casos), Formulário para Seguimento (somente para os casos), Folha de Registro para Casos e Controles, Números de Identificação e Etiquetas com Código de Barras, protocolo de Preparação das Amostras de Sangue e Tecidos, Termo de Consentimento Informado para Casos e Controles, Declaração CONEP.

Juntamente ao Recurso ao Parecer CONEP N°. 611/2011, os seguintes documentos foram apresentados: 1. Solicitação de recurso; 2. Resposta do Pesquisador; 3. Parecer Consubstanciado CEP – Famerp; 4. Folha de Rosto modificada; 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão de novembro/2011; 6. Projeto (anexo separado do recurso ao parecer CONEP 611/2011).

### **Considerações sobre a análise do recurso ao Parecer CONEP N°. 611/2011, relativo ao projeto de pesquisa em questão:**

1 Em declaração de 12 de maio de 2011 (Anexo “Declaração CONEP”, página 2), a pesquisadora responsável informa que “O projeto compreende a primeira iniciativa concreta de obtenção de financiamento com o objetivo de organizar no futuro uma rede brasileira sobre câncer de cabeça e pescoço, que se integrará à rede mundial denominada InterCHANGE”. Adicionalmente, “O nome InterCHANGE reflete a colaboração que ocorrerá entre vários grupos de diferentes países, envolvidos na pesquisa de aspectos relevantes dos tumores de cabeça e pescoço” (trechos em destaque já grifados no original). Mais à frente, “A etapa citada nesses dois parágrafos, que corresponde ao Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço (INTERCHANGE -BRASIL), não tem previsão de início e só será desenvolvida após aprovação pela CONEP, em solicitação posterior específica para esse Estudo Internacional”. Portanto, fica esclarecido que a análise constante do presente documento não inclui a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE. **Resposta:** “Reafirmamos que a presente solicitação de parecer para o projeto FAPESP 10/51168-0 não inclui no momento a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE. A realização do presente projeto é contributiva para a implementação da rede InterCHANGE, considerando que ele, com os resultados positivos e possíveis dificuldades, servirá de modelo para o delineamento de projetos dos outros grupos que integrarão a rede”. **Análise:** Os esclarecimentos apresentados estão em acordo com os destaques apontados no



Parecer. **Pendência atendida.**

2 A pesquisa em tela não atende à classificação de estudos em Biossegurança do Sistema CEP/CONEP (vide Carta 0213/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010). Portanto, solicita-se a correspondente retificação da Folha de Rosto. **Resposta:** “A Folha de Rosto foi retificada”. **Análise:** A retificação solicitada na Folha de Rosto foi realizada. **Pendência atendida.**

3 Em decorrência do exposto na página 22/57 do projeto (item 6.5 Tamanho da amostra) (“Considerando-se a média mensal de casos recrutados durante o desenvolvimento do Projeto GENCAPO (Fase I), estima-se que no período de condução deste estudo nos cinco centros clínicos será possível identificar cerca de 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles de base hospitalar. Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de

sangue periférico [...]”), verifica-se que o número total de sujeitos previsto na Folha de Rosto (n = 1.000) encontra-se em desacordo. Solicita-se a apresentação dos esclarecimentos cabíveis e/ou retificação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP. **Resposta:** “O número correto é 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles. Este é o número previsto de casos e controles. A Folha de Rosto foi retificada”. **Análise:** Uma vez que o número total de participantes foi estabelecido em 2.400 (1.200 casos novos de CECP e 1.200 controles), excluiu-se a participação dos “[...] pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico”, que somam 1422 casos e 541 controles. No entanto, tal afirmação contrapõe-se à resposta apresentada em atendimento à Consideração “5.b” (vide abaixo), na qual se verifica a manutenção da intenção de uso de amostras armazenadas anteriormente. Adicionalmente, a nova Folha de Rosto apresenta a quantia “1.200” no campo “No. de Sujeitos Total”, o que denuncia equívoco quanto a este informe específico. Portanto, a alteração realizada na Folha de Rosto não contempla a efetiva casuística prevista pelos pesquisadores.

**Pendência não atendida. Recurso:** “A Folha de Rosto foi retificada: o número total de participantes é 2.400 (1.200 casos de CECP e 1.200 controles, cujos dados e amostras serão coletados prospectivamente). Serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO (Fase I), que somam 1422 casos e 541 controles.”. **Análise:**

**Recurso parcialmente atendido.** Em atendimento, a Folha de Rosto retificada foi apresentada. No entanto, os Termos de Compromisso do pesquisador responsável e do responsável pela Instituição proponente, apesar de assinados, não se encontram datados. Ressalta-se que todos os campos da Folha de Rosto devem ser preenchidos, sobretudo os referentes a assinaturas e datas, pois trata-se de um documento que dá consistência jurídica ao projeto. Os compromissos assumidos pelos respectivos responsáveis legais devem estar datados, uma vez que, em momento futuro, estes poderão ser substituídos. Desta forma, procura-se garantir respaldo às partes envolvidas, caso seja necessário. Solicita-se adequação. 4. Em relação aos Termos de Consentimento Informado para Casos e Controles cabem as seguintes considerações:

a. Os documentos devem ser renomeados como “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, pois esta é a nomenclatura utilizada por determinação das Resoluções pertinentes do Conselho Nacional de Saúde. Solicita-se adequação.

**Resposta:** “O documento foi renomeado (ver DOCUMENTO 1)”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

b. Na página 1/2 (item INTRODUÇÃO) dos Termos se lê: “Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas” (não grifado no original). Apesar da palavra “tumor” ser citada em outros pontos do documento, não há menção à condição específica em estudo, qual seja, câncer de cabeça e pescoço. Solicita-se

adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a). **Resposta:** “A condição específica foi acrescentada na linha 2 do item INTRODUÇÃO dos TCLEs”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

c. Não consta informe quanto ao envio de amostra para análise no exterior. Uma vez que o sujeito da pesquisa, ou representante legal, pode considerar esta informação relevante no seu processo decisório, solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a). **Resposta:** “Esta informação foi acrescentada ao TCLE. Ver: linhas 3-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para casos linhas 2-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para os controles”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

d. Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: “Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo” (não grifado no original). No entanto, considerando o cronograma da pesquisa, com duração prevista de cinco anos, e o disposto no item 3 da Resolução CNS 347/05 (“O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material”). Solicita-se adequação. **Resposta:** “Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 5-7 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS dos TCLEs”. **Análise:** O trecho destacado no TCLE original foi substituído por “Suas amostras serão armazenadas por 5 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas do presente estudo e, caso haja necessidade de prolongar esse tempo, você será chamado para confirmar ou não essa alteração”. Ou seja, a adequação solicitada foi realizada. Cabe ressaltar que a extensão de prazo de armazenamento em Biorrepositório não necessita de autorização do sujeito e, sim, do CEP que autorizou a pesquisa (Resolução CNS 441/11, item 12.1). Finalmente, se houver intenção de constituição de um Biobanco, deve-se apresentar o respectivo Protocolo de Desenvolvimento, à luz das disposições contidas na Resolução CNS 441/11 (contém as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores) para análise pelo Sistema CEP/CONEP. **Pendência atendida.**

e. Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, you concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo” (não grifado no original). No entanto, considerando as diretrizes contidas nos itens III.12 da Resolução CNS 340/04 (“Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal [...]”) e 6.2.d da Resolução CNS 347/05 (“Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir: [...] d) TCLE específico para nova pesquisa [...]”), solicita-se adequação. Substituir a autorização imediata para usos futuros prevista no Termo proposto pela autorização para armazenamento com vistas à possível utilização futura, quando nesta situação, salvo por futura dispensa autorizada do CEP, o sujeito será consultado quanto a sua vontade de participar de nova pesquisa.

**Resposta:** “Qualquer estudo futuro será submetido ao CEP antes de iniciado. Por esse motivo, no item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: “Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento deverá ser aprovado por você ou seu representante e por um comitê de ética””. **Análise:** A adequação solicitada não foi realizada. A frase “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se

relacionam com o objetivo do presente estudo” foi mantida na nova versão dos TCLEs propostos para o estudo. No entanto, uma vez que o referido banco de materiais biológicos humanos não se encontra formatado como um Biobanco e, sim, como um Biorrespositório, a autorização *a priori* de pesquisas futuras não se aplica. Ainda, “O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrespositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS)” (Resolução CNS 441/2011, item 6).

**Pendência não atendida. Recurso:** “No item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: “Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo”. No item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO de ambos os TCLE, a frase “As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde” foi modificada para: As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação e para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde.”. **Análise:** Em atendimento, foram apresentadas novas versões (“Novembro 2011”) dos TCLEs do estudo. As alterações efetuadas contemplam os esclarecimentos e garantias necessárias apontadas nos pareceres anteriores.

**Recurso atendido.**

f. Na página 1/2 (item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO) dos Termos se lê: “Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para você” (não grifado no original). No entanto, conforme dispõe o item V.1.d da Resolução CNS 340/2004, deve ser ofertado e garantido ao sujeito a opção de tomar ou não conhecimento sobre as informações geradas a partir do seu material biológico cedido para a pesquisa. Solicita-se adequação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP. **Resposta:** “O TCLE foi retificado com a informação: ...”mas esses resultados estarão disponíveis para o(a) Sr.(a)”. Ver:linhas 5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO do TCLE para casos linhas 4-5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO doTCLE para os controles”.**Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

g. Na página 2/2 (item BENEFÍCIOS POTENCIAIS) dos Termos se lê: “Não haverá benefícios diretos para você que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica” (não grifado no original). No entanto, a frase destacada pode induzir o sujeito a participar da pesquisa, uma vez que coloca sobre o indivíduo a pressão pelo alcance do sucesso do estudo. Solicita-se, portanto, que o trecho destacado seja retirado dos Termos. **Resposta:** “A frase destacada foi retirada dos TCLEs”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada.

**Pendência atendida.**

h. Conforme preconizado nos itens IV.1.i e V.6 da Resolução CNS 196/96, além do direito à assistência integral, os sujeitos da pesquisa têm direito à indenização, em caso de danos previstos ou não. Portanto, solicita-se adequar os Termos com a inclusão, de modo claro e afirmativo, da garantia à indenização, em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa. **Resposta:** “Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs”.

**Análise:** Em atendimento, a seguinte frase “Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital” foi substituída por “Se estes

danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital e terá assistência integral” (item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS). Percebe-se, portanto, que a garantia à indenização não foi incluída, apesar de claramente indicada no Parecer. Cabe, então, destacar o disposto no item V.7 da Resolução CNS 196/96: “Jamais poderá ser exigido do sujeito da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano. O formulário do consentimento livre e esclarecido não deve conter nenhuma ressalva que afaste essa responsabilidade ou que implique ao sujeito da pesquisa abrir mão de seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais”. Portanto, considera-se que a pendência “4.h” não foi resolvida. **Pendência não atendida. Recurso:** “Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs: “Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais”.” **Análise:** A inclusão da garantia à indenização em caso de danos relativos à pesquisa foi realizada nas novas versões dos TCLE do estudo. **Recurso atendido.**

i. Não foram apresentadas as formas de contato com o CEP responsável pelo acompanhamento do estudo, que poderá ser questionado em caso de denúncia ou dúvidas relativas à ética da pesquisa. Solicita-se que sejam acrescentados aos Termos o telefone e o endereço do CEP, assim como uma breve descrição do seu papel. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

**Resposta:** “Foram acrescentados os endereços e os telefones do responsável pelo acompanhamento do estudo e do CEP da Instituição”. **Análise:** A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

5. Em diferentes pontos do projeto é declarada a intenção de uso de amostras armazenadas no contexto de pesquisa anterior (p. ex., “[...] a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tornando a amostra disponível para análise mais robusta” / página 22/57; e “O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9) / página 42/57)” (grifos nossos). Portanto, solicita-se a apresentação de:

a. Cópia do TCLE utilizado quando da pesquisa em que o material biológico foi colhido e armazenado, em atendimento ao disposto no item

6.2.c da Resolução CNS 347/05. **Resposta:** “O TCLE do projeto GENCAPO (Fase I), projeto FAPESP04/12054-9 é apresentado como DOCUMENTO 2”. **Análise:** A solicitação indicada foi atendida. **Pendência atendida.**

b. Modelo de TCLE, específico para a pesquisa em tela, destinado aos sujeitos cujas amostras já se encontram armazenadas ou a justificativa para dispensa de obtenção do consentimento individual, em atendimento ao disposto no item 6.2.d da Resolução CNS 347/05. A declaração à página 42/57, item 8. PROCEDIMENTOS ÉTICOS, “Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico” não é considerada suficiente. **Resposta:** “No momento de inclusão das amostras armazenadas e, portanto, após aprovação dos protocolos da pesquisa em tela pela CONEP, faremos uma emenda com solicitação de isenção de TCLE para o CEP da instituição, com apresentação dos locais do projeto modificados e justificativas para dispensa de obtenção do consentimento individual”. **Análise:** O conteúdo da emenda mencionada deveria ter sido apresentado à análise ética como parte integrante do projeto em tramitação. Portanto, considera-se que a pendência “5.b” não foi solucionada adequadamente. **Pendência não atendida. Recurso:** “Resposta ao Parecer CONEP 611/2011: Considerando que serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO Fase I (1422 casos e 541 controles), não apresentaremos emenda para análise. Salientamos que as frases abaixo foram

retiradas do projeto: Página 5, última frase do item 1: “Deve-se destacar que muitas das análises propostas a serem conduzidas no escopo do presente projeto (GENCAPO Fase II) devem integrar as informações já disponíveis no GENCAPO (Fase I). Página 22, item 6.5: “Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tornando a amostra disponível para análise mais robusta. Essas amostras serão utilizadas após a obtenção do consentimento do indivíduo doador ou de seu representante legal para uso futuro ou após obtenção do CEP/CONEP para dispensa do TECL nos casos com justificativa de impossibilidade de contato (doador falecido, tentativas de contato sem sucesso ou outros). Considere-se também que há intenção de juntar esses casos e controles aos de outros estudos no Brasil e internacionais para ampliar o poder do estudo.” Página 39, item 6.21.1: “Os dados gerados pela presente proposta serão integrados aos dados do GENCAPO Fase I, buscando garantir maior poder estatístico.” Página 42, item 8: “O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9), das quais arquivou o termo de consentimento para sua utilização em pesquisa de biomarcadores de CECPs. Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico. Nos casos de impossibilidade de contato, a aprovação para realização do estudo dessas amostras será solicitada aos comitês de ética de cada instituição.”. **Análise:** Conforme exposto, os proponentes do estudo em tela decidiram pela não utilização das amostras coletadas no contexto do projeto GENCAPO Fase I, dispensando-se, portanto, a apresentação do modelo de TCLE específico e da emenda mencionados nos pareceres anteriores. **Recurso atendido.**

1 Conforme informado à página 27/57 (item 6.12 HPV), ao menos 100 µL de plasma serão necessários para a análise de anticorpos para proteínas do HPV, a ser realizada no DKFZ (Centro de Pesquisas em Câncer de Heidelberg, Alemanha), sob a supervisão do Dr. Michael Pawlita. Portanto, em atendimento ao disposto no item VII.5 da Resolução CNS 292/99, solicita-se a apresentação de declaração do colaborador alemão quanto ao uso do material biológico e dos dados e informações coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo. **Resposta:** “O documento é apresentado no DOCUMENTO 3”. **Análise:** A solicitação indicada na Consideração “6” foi atendida. **Pendência atendida.**

2 Segundo o Cronograma apresentado (Anexo 12), a coleta de amostras e dados de pacientes teria início no primeiro mês de 2011. Solicita-se esclarecer se a pesquisa já teria iniciado e, em caso negativo, a apresentação de cronograma atualizado. **Resposta:** “A pesquisa ainda não foi iniciada. O novo cronograma é apresentado no DOCUMENTO 4”. **Análise:** Foi apresentado novo cronograma referente às atividades relativas ao ano em curso, com previsão de inclusão de sujeitos de pesquisa a partir de setembro. O cronograma referente ao período 2012 a 2015 não foi reapresentado,

do que se depreende que não tenha sido alterado. Consta compromisso com início somente após a aprovação do projeto pela CONEP.

**Pendência atendida.**

**Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 03 acima, antes do início do estudo.**

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

**OBS:** No Brasil, além da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP) informa-se a participação dos seguintes centros: Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos/SP (André Lopes Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa CEP da Fundação Pio XII); Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital ACCamargo/SP (Emmanuel Dias-Neto/Comitê de Ética em Pesquisa -CEP do Hospital ACCamargo); Faculdade de Odontologia da USP/SP (Fábio Daumas Nunes/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP); Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, SP (José Eduardo Levi/Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/SP (Luisa Lina Villa/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alemão Oswaldo Cruz); Hospital Heliópolis/SP (Marcos Brasilino de Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis); Faculdade de Medicina da USP/SP (Pedro Michaluart Jr/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP); Faculdade de Saúde Pública da USP/SP (Victor Wünsch Filho/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP); Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em Ribeirão Preto/SP (Andréia Machado Leopoldino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto); Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho/SP (José Francisco de Góis Filho/Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho); UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira/SP (Flávia C. Rodrigues-Lisoni/Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira); Centro de Pesquisa Experimental, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein/SP (Patrícia Severino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Jossi Ledo Kanda/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC); Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo/SP (Karina B. Ribeiro/Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos -Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo); e Instituto de Biociências da USP/SP (Tiago V. Pereira/Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa -CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise

do projeto.

**NOTA:** *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde: 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa"; 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa; 3) vínculos do pesquisador; 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas; Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.*

Brasília, 02 de março de 2012.

  
**Gyselle Saddi Tannous**  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

## ANEXO E -

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DEMOGRÁFICA, CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM NEOPLASIA DE CABEÇA E PESCOÇO E TIREÓIDE

**Pesquisador:** André Bandiera de Oliveira Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32884214.5.0000.0065

**Instituição Proponente:** FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 743.366

**Data da Relatoria:** 23/07/2014

**Apresentação do Projeto:**

Estudo retrospectivo e prospectivo fará análise demográfica, clínica, histopatológica e molecular de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço e tireóide.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudo em 500 pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço e tireóide analisará uma série de variáveis clínicas e laboratoriais. As variáveis laboratoriais consistem na análise de biomarcadores séricos e de histopatologia das biópsias obtidas na rotina diagnóstica destas neoplasias no Serviço de Cirurgia de cabeça e Pescoço.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos mínimos. Benefícios não.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Protocolo de estudo observacional de interesse científico não adicionando riscos significativos aos realizados de rotina pelo Serviço.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados

**Recomendações:**

Não

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br



FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 743.366

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

aprovado

SAO PAULO, 08 de Agosto de 2014

---

**Assinado por:**  
**Roger Chammas**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

## 10 REFERÊNCIAS

1. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2018.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer.* 2002;2(5):342-50.
3. Khanal S, Shumway BS, Zahin M, Redman RA, Strickley JD, Trainor PJ, et al. Viral DNA integration and methylation of human papillomavirus type 16 in high-grade oral epithelial dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(54):30419-33.
4. Tam S, Fu S, Xu L, Krause KJ, Lairson DR, Miao H, et al. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;82:91-9.
5. Shanta V, Krishnamurthi S, Gajalakshmi CK, Swaminathan R, Ravichandran K. Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. *J Indian Med Assoc.* 2000;98(2):49-52.
6. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol (Rome).* 2017;10(3):209-20.
7. Villa A, Hanna GJ. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *Curr Probl Cancer.* 2018.
8. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology.* 2015;25:2-23.
9. de Sanjose S, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:2-13.
10. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology.* 1999;189(1):12-9.
11. Cancer IAfRo. Chapter 2: Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual [Available from: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2>].
12. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006;2006 Suppl:40470.
13. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong ZY, Xiao WH, Kahle L, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *Jama-Journal of the American Medical Association.* 2012;307(7):693-703.
14. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(36):4550-9.
15. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, Gonzalez P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2010;37(6):386-91.
16. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009;125(2):362-6.
17. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *G Ital Mai Venereol.* 1907;48:12-7.

18. Strauss MJ, Shaw EW, et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949;72(1):46-50.
19. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S1-6.
20. Zurhausen H. CONDYLOMATA ACUMINATA AND HUMAN GENITAL CANCER. *Cancer Research.* 1976;36(2):794-.
21. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology.* 2005;32:S7-S15.
22. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013;445(1-2):2-10.
23. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
24. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *Bmj.* 2009;339:b2569.
25. Schabath MB, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Salmeron J, Quiterio M, Giuliano AR, et al. Smoking and Human Papillomavirus (HPV) Infection in the HPV in Men (HIM) Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2012;21(1):102-10.
26. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol.* 2018;99(8):989-90.
27. Bravo IG, Felez-Sanchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health.* 2015;2015(1):32-51.
28. Villa LL. CHAPTER 1 Biology of genital human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;94 Suppl 1:S3-s7.
29. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses.* 2018;10(2).
30. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gomez-Ceron C, Garcia-Suastegui WA, Fierros-Zarate Gdel S, Jacobo-Herrera NJ. HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol Int.* 2013;2013:912780.
31. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015;7(7):3863-90.
32. Gariglio P, Gutierrez J, Cortes E, Vazquez J. The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Archives of Medical Research.* 2009;40(6):449-65.
33. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010;117(2 Suppl):S5-10.
34. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.* 2001;82(1):15-33.
35. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30:F55-F70.
36. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J.* 2010;7:11.
37. Moody CA. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. *Viruses-Basel.* 2017;9(9).
38. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science.* 2006;110(5):525-41.

39. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60.
40. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):46-54.
41. Allen CT, Lewis JS, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human Papillomavirus and Oropharynx Cancer: Biology, Detection and Clinical Implications. *Laryngoscope*. 2010;120(9):1756-72.
42. Campisi G, Giovannelli L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol*. 2009;1:8.
43. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(17):2201-21.
44. Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, Buonaguro L, Buonaguro FM. Human Oncoviruses and p53 Tumor Suppressor Pathway Deregulation at the Origin of Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2018;10(7).
45. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
46. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018.
47. Câncer I-IND. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativas 2018 2018 [Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>].
48. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
49. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*. 2011;2011:509036.
50. Mazul AL, Taylor JM, Divaris K, Weissler MC, Brennan P, Anantharaman D, et al. Oral health and human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2017;123(1):71-80.
51. Lopez RVM, Zago MA, Eluf-Neto J, Curado MP, Daudt AW, da Silva WA, et al. Education, tobacco smoking, alcohol consumption, and IL-2 and IL-6 gene polymorphisms in the survival of head and neck cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011;44(10):1006-12.
52. Carvalho AL, Ikeda MK, Magrin J, Kowalski LP. Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution. *Oral Oncology*. 2004;40(1):71-6.
53. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
54. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
55. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9).
56. Bertolus C, Goudot P, Gessain A, Berthet N. Clinical relevance of systematic human papillomavirus (HPV) diagnosis in oral squamous cell carcinoma. *Infectious Agents and Cancer*. 2012;7.
57. IARC IAfRoC-. Cancers Attributable to Infections 2012 [Available from: [http://gco.iarc.fr/causes/infections/tools-pie?mode=2&sex=0&population=who&continent=0&country=0&cancer=0&key=attr\\_cases&lock\\_scale=0&pie\\_mode=1&nb\\_results=5](http://gco.iarc.fr/causes/infections/tools-pie?mode=2&sex=0&population=who&continent=0&country=0&cancer=0&key=attr_cases&lock_scale=0&pie_mode=1&nb_results=5)].

58. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
59. Husain N, Neyaz A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2017;7(3):198-205.
60. 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.
61. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *American Journal of Pathology*. 2003;162(3):747-53.
62. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Onelov L, Joneberg J, et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *International Journal of Cancer*. 2006;119(11):2620-3.
63. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):24-35.
64. Geissler K, Markwart R, Requardt RP, Weigel C, Schubert K, Scherag A, et al. Functional characterization of T-cells from palatine tonsils in patients with chronic tonsillitis. *Plos One*. 2017;12(9).
65. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):111-20.
66. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S48-54.
67. Manthiram K, Correa H, Boyd K, Roland J, Edwards K. Unique histologic features of tonsils from patients with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Clin Rheumatol*. 2017.
68. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, et al. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology*. 2010;56(7):957-67.
69. Beachler DC, Sugar EA, Margolick JB, Weber KM, Strickler HD, Wiley DJ, et al. Risk factors for acquisition and clearance of oral human papillomavirus infection among HIV-infected and HIV-uninfected adults. *Am J Epidemiol*. 2015;181(1):40-53.
70. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med*. 2011;53 Suppl 1:S12-21.
71. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, et al. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *International Journal of Cancer*. 2007;120(7):1418-25.
72. Ilmarinen T, Munne P, Hagstrom J, Haglund C, Auvinen E, Virtanen EI, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection and cancer gene mutations in nonmalignant tonsils. *Oral Oncol*. 2017;73:77-82.
73. do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Ruback MJC, Bonilha JL, Fernandes AM, et al. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *Journal of Medical Virology*. 2006;78(5):614-8.
74. Rieth KKS, Gill SR, Lott-Limbach AA, Merkley MA, Botero N, Allen PD, et al. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Tonsil Tissue in Healthy Adults and Colocalization in Biofilm of Tonsillar Crypts. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;144(3):231-7.

75. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5694-9.
76. Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004;66(3):155-8.
77. Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Dorpmans E, Struik J, Tran Ba Huy P, et al. Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope.* 2008;118(1):128-34.
78. Knight GL, Needham L, Ward D, Roberts S. Pilot study investigating the prevalence of oral Human Papilloma Viral (HPV) infection in young adults. *Public Health.* 2016;132:105-7.
79. Matos LL, Miranda GA, Cernea CR. Prevalence of oral and oropharyngeal human papillomavirus infection in Brazilian population studies: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015;81(5):554-67.
80. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral Sexual Behaviors Associated with Prevalent Oral Human Papillomavirus Infection. *Journal of Infectious Diseases.* 2009;199(9):1263-9.
81. Kreimer AR, Campbell CMP, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet.* 2013;382(9895):877-87.
82. Campbell CMP, Kreimer AR, Lin HY, Fulp W, O'Keefe MT, Ingles DJ, et al. Long-term Persistence of Oral Human Papillomavirus Type 16: The HPV Infection in Men (HIM) Study. *Cancer Prevention Research.* 2015;8(3):190-6.
83. Lingen MW. Brush-based cytology screening in the tonsils and cervix: there is a difference! *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(9):1350-2.
84. Harle A, Guillet J, Thomas J, Sastre-Garau X, Rouyer M, Ramacci C, et al. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples. *Sci Rep.* 2018;8(1):11313.
85. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Caleca MP, Bellavia C, Perino A, et al. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a meta-analysis of the literature. *Oral Oncol.* 2011;47(4):244-50.
86. Filho AL, Schmitt FC. Cytology education in the 21st century: living in the past or crossing the Rubicon? *Acta Cytol.* 2010;54(4):654-6.
87. Mahmoodi P, Fani M, Rezayi M, Avan A, Pasdar Z, Karimi E, et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *Biofactors.* 2018.
88. Lingen MW. Screening for oral premalignancy and cancer: what platform and which biomarkers? *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(9):1056-9.
89. Lingen MW. Can saliva-based HPV tests establish cancer risk and guide patient management? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110. United States 2010. p. 273-4.
90. Prevention C-CfDCa. Genital HPV Infection - Fact Sheet 2017 [Available from: <https://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm#common>].
91. Panwar A, Batra R, Lydiatt WM, Ganti AK. Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(2):215-9.
92. Erhart SM, Rivero ER, Bazzo ML, Onofre AS. Comparative evaluation of the GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets for HPV detection by PCR in oral squamous cell carcinomas. *Exp Mol Pathol.* 2016;100(1):13-6.

93. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S43-51.
94. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
95. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29(3):151-9.
96. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2508-17.
97. Stevens MP, Garland SM, Tabrizi SN. Human papillomavirus genotyping using a modified linear array detection protocol. *J Virol Methods.* 2006;135(1):124-6.
98. Tewari P, White C, Kelly L, Pilkington L, Keegan H, D'Arcy T, et al. Clinical performance of the Cobas 4800 HPV test and the Aptima HPV assay in the management of women referred to colposcopy with minor cytological abnormalities. *Diagn Cytopathol.* 2018;46(12):987-92.
99. Veo CA, Saad SS, Fregnani JH, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, Resende JC, et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumour Biol.* 2015;36(7):5399-405.
100. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(9):1369-78.
101. Mujtaba H, Wang Y, Duan Y, Cao M, Zhang N, Batool I, et al. Human papillomavirus in tonsillectomy specimen from China and Pakistan - Prevalence and genotype distribution. *Pathol Res Pract.* 2018;214(10):1713-8.
102. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1319-31.
103. Williamson AJ, Gajra A. *Cancer, Tonsil.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
104. Weatherspoon DJ, Chattopadhyay A, Boroumand S, Garcia I. Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000-2010. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(4):497-504.
105. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(5):380-6.
106. Combes JD, Dalstein V, Gheit T, Clifford GM, Tommasino M, Clavel C, et al. Prevalence of human papillomavirus in tonsil brushings and gargles in cancer-free patients: The SPLIT study. *Oral Oncol.* 2017;66:52-7.
107. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(1):78-84.
108. Horewicz VV, Feres M, Rapp GE, Yasuda V, Cury PR. Human papillomavirus-16 prevalence in gingival tissue and its association with periodontal destruction: a case-control study. *J Periodontol.* 2010;81(4):562-8.
109. Tristao W, Ribeiro RM, Oliveira CA, Betiol JC, Bettini Jde S. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(4):66-70.

110. Cavenaghi VB, Ghosn EJ, Cruz N, Rossi LM, da Silva L, Costa HO, et al. Determination of HPV prevalence in oral/oropharyngeal mucosa samples in a rural district of Sao Paulo. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79(5):599-602.
111. Marques Mda P, Bussoloti Filho I, Rossi LM, Andreoli MA, Cruz NO. Comparative study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015;81(6):598-603.
112. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, et al. 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.
113. Wiley DJ, Wiesmeier E, Masongsong E, Gyls KH, Koutsky LA, Ferris DG, et al. Smokers at higher risk for undetected antibody for oncogenic human papillomavirus type 16 infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(5):915-20.
114. 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.
115. Chung CH, Bagheri A, D'Souza G. Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncol.* 2014;50(5):364-9.