



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

STELLA VIDAL DE SOUZA TORRES

PRESENÇA DE DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM BIÓPSIAS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PACIENTES ADULTOS E IDOSOS COM
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

*PRESENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN SQUAMOUS CELL
CARCINOMA BIOPSIES IN ADULTS AND ELDERLY WITH HEAD AND NECK
CANCER*

CAMPINAS

2017

STELLA VIDAL DE SOUZA TORRES

**PRESENÇA DE DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM BIÓPSIAS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PACIENTES ADULTOS E IDOSOS COM
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

***PRESENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN SQUAMOUS CELL
CARCINOMA BIOPSIES IN ADULTS AND ELDERLY WITH HEAD AND NECK
CANCER***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Gerontologia

Thesis presented to the Graduate Program in Gerontology Faculty of Medical Sciences, Campinas State University as part of the requirements for obtaining a PhD degree in Gerontology

**ORIENTADORA: SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA
COORIENTADORA: SANDRA HELENA ALVES BONON**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA STELLA VIDAL DE SOUZA TORRES, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 1P-3888/2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

T636p Torres, Stella Vidal de Souza, 1967-
Presença de DNA de papilomavírus humano em biópsias de carcinoma
espinocelular de pacientes adultos e idosos com câncer de cabeça e pescoço /
Stella Vidal de Souza Torres. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa.
Coorientador: Sandra Helena Alves Bonon.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Idoso. 2. Neoplasias de cabeça e pescoço. 3. Vírus oncogênicos. 4.
Papillomaviridae. 5. Infecções tumorais por vírus. I. Costa, Sandra Cecília
Botelho, 1951-. II. Bonon, Sandra Helena Alves. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Presence of human papillomavirus DNA in squamous cell
carcinoma biopsies in adults and elderly with head and neck cancer

Palavras-chave em inglês:

Aged

Head and neck neoplasms

Oncogenic viruses

Papillomaviridae

Tumor virus infections

Área de concentração: Gerontologia

Titulação: Doutora em Gerontologia

Banca examinadora:

Sandra Cecília Botelho Costa [Orientador]

Luis Augusto Passeri

Maria Patelli Juliani Souza Lima

Agueda Cleofe Marques Zaratini

André Fattori

Data de defesa: 28-09-2017

Programa de Pós-Graduação: Gerontologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

STELLA VIDAL DE SOUZA TORRES

ORIENTADORA: SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

COORIENTADORA: SANDRA HELENA ALVES BONON

MEMBROS:

1. PROF^a. DR^a. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA - PRESIDENTE DA BANCA

2. PROF^a. DR^a. MARIA JULIANE PATELLI LIMA

3. PROF^a. DR^a. ÁGUEDA CLEOFE MARQUES ZARATIN

4. PROF. DR^a. ANDRÉ FATTORI

5. PROF. DR. LUIS AUGUSTO PASSERI

Programa de Pós-Graduação em Gerontologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A Ata da Defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta no processo de vida acadêmica da aluna.

Data: 28/09/2017

DEDICATÓRIA

“A todos os pacientes que, diariamente, recebem o diagnóstico de câncer e se entregam de corpo e alma aos nossos cuidados”.

EPÍGRAFE

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã”.

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Sandra Cecília Botelho Costa pelo privilégio de ser sua aluna, por incentivar meu aprendizado, por abrir novos horizontes e por me conduzir serenamente por este caminho. À ela, toda a minha gratidão!!

À Professora Dra. Sandra Helena A. Bonon pelas contribuições feitas ao longo da fase laboratorial da pesquisa proporcionando o seu avanço.

Às Professoras Anita Liberalesso Neri e Maria Elena Guariento por transmitir, aos seus alunos, os fundamentos gerontológicos com tanta sabedoria, dedicação e carinho.

Às Professoras Dras. Albina Messias de Almeida Milani Altemani e Fernanda Viviane Mariano pela disposição e competência em dividir seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone por propiciar a entrada ao Ambulatório de Otorrinolaringologia para que a pesquisa fosse realizada.

À Cecília Regina G. Frazatto, cirurgiã-dentista, responsável pelo Serviço de Odontologia do HC/Unicamp, pela gentileza em oferecer as condições necessárias para as coletas das amostras estudadas.

Aos meus colegas de Doutorado em Gerontologia: Alexandre, Ana Maria, Arlete, Gláucia, Giovana, Rosalia, Talita e Yaeko pelo tempo de convivência, compartilhamento de saberes e vínculos de amizade.

Aos alunos do Laboratório de Vírus: Alex Reis, Aline Lima, Andreia Gulin, Beatriz Piastrelli, Carla Rimério, Caroline Baldi, César Machado, Daniel Catalan, Ivone Silva, Jessica Pereira, Lirian Samejima, Lucas Leon, Murilo Bonatelli, Paula Telles, Paulo Carriel, Priscila Mompean, Priscila Silva, Renato Oliveira, Silvia Menoni, Talita Dellariva e Thamyres Fajardo, por todas as dicas e sugestões e por tornarem a pesquisa mais alegre e empolgante.

Ao Rodrigo Lima e Andreia Gulin por me ensinarem os primeiros passos. Muito obrigada!!

À querida Alessandra Sbegue, aluna de iniciação científica, cujo auxílio durante a coleta e tratamento de dados foi fundamental.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas (PG-FCM) pela prontidão, atenção e eficiência em auxiliar-nos em todos os momentos.

À funcionária Márcia Leite Alves, do setor de Informática do HC/FCM/ Unicamp, pela ajuda primorosa na busca e seleção dos casos.

Aos funcionários da Biblioteca da FCM, especialmente à Ana Paula, Daniel e Patrícia, pelo auxílio cuidadoso na editoração da Tese.

À querida amiga Alícia Pelozo Chelenko pelos últimos acertos. Muito obrigada!!

Ao Gabriel Solyzko pelo tratamento estatístico dos dados de pesquisa.

À minha família por aceitar e entender que é preciso seguir adiante apesar das dificuldades. Amo vocês!!

Aos meus pais José e Ophélia (In memoriam) que souberam, desde muito cedo, despertar em mim o gosto pelos estudos.

À CAPES pelo apoio financeiro destinado à elaboração da pesquisa.

À Deus pelo dom de minha vida, pela graça de ter colocado pessoas tão especiais que me proporcionaram momentos de alegria, de dúvidas e de resoluções necessárias ao meu aprendizado.

RESUMO

Mesmo com avançadas modalidades terapêuticas, o carcinoma espinocelular se mostra como responsável pelo aumento da taxa de mortalidade da maioria dos pacientes diagnosticados com neoplasias de cabeça e pescoço. Tumores de cabeça e pescoço associados ao vírus HPV se comportam de modo diferente dos demais. A replicação do HPV ocorre no núcleo das células escamosas e seu ciclo de vida está diretamente relacionado ao programa de diferenciação celular da célula hospedeira. Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência do papilomavírus humano (HPV) em biópsias de tecidos neoplásicos obtidos de pacientes com diagnóstico de neoplasias de cabeça e pescoço. Foram selecionados um total de sessenta e oito biópsias de tecidos à fresco e parafinadas. Utilizou-se de técnicas de Biologia Molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase tipo *nested* (*n*-PCR) para a detecção do DNA viral. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp e o TCLE fornecido e assinado por todos os participantes. Os dados obtidos foram tabulados, organizados e armazenados em planilhas do Programa Office Excel e submetidos à análise estatística. O nível de significância para todas as análises foi de 5%, ou valores de $p < 0,05$. Treze amostras foram positivas para a presença do DNA de HPV (19,12%), sendo sete casos para as amostras à fresco (35%) e seis para as amostras parafinadas (12,5%). Entre as amostras à fresco ($n=20$), a maioria dos casos positivos era constituída por homens, brancos e casados com média de idade de 53,3 anos. Quanto à localização, 71,4% dos tumores eram de laringe, classificados como moderadamente diferenciados e se apresentavam no estágio IV de estadiamento, tendo cirurgia, quimio e radioterapia como procedimentos terapêuticos. Todos possuíam história de tabagismo e 85,5% de etilismo. As amostras parafinadas ($n=48$), apontaram a média de idade de 68,5 anos. A maioria (83,3%) composta por homens, casados (66,6%) e brancos. Em 50% dos casos, a região mais atingida foi a laringe e 83,3% como moderadamente diferenciados. Quanto ao estadiamento, 50% foram classificados no estágio III, apresentando a cirurgia de ressecção do tumor como medida terapêutica mais utilizada. Todos reportaram tabagismo e 66,6% etilismo. A proporção de HPV positivo foi maior entre a população adulta e os achados histopatológicos mostraram a presença de células com coilocitose em ambas as amostras. O DNA do vírus HPV foi mais prevalente em neoplasias de laringe e cavidade oral, cujos tecidos apresentavam-se como moderadamente diferenciados. O diagnóstico tardio e o início do tratamento em estágios avançados da doença indicam a necessidade de planejamento de ações de intervenção e/ou educativas precoces com a finalidade de diminuir os efeitos negativos de eventos que possam ocorrer com o avanço da doença, permitindo a possibilidade de cura e a melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

Palavras-chave: Idoso, Neoplasias de Cabeça e Pescoço, Vírus Oncogênicos, *Papillomaviridae* (HPV), Infecções Tumoriais por Vírus.

ABSTRACT

Even with advanced therapeutic modalities, squamous cell carcinoma is shown to be responsible for the increased mortality rate of the majority of patients diagnosed with head and neck neoplasms. Tumors of head and neck associated with the HPV virus behave differently from the others. HPV replication occurs in the nucleus of squamous cells and its life cycle is directly related to the cell differentiation program of the host cell. This study aimed to evaluate the prevalence of human papillomavirus (HPV) in neoplastic tissue biopsies obtained from patients with head and neck neoplasms. A total of sixty-eight fresh tissue and paraffin-embedded biopsies were selected. Molecular Biology techniques such as the nested-type Polymerase Chain Reaction (nested-PCR) were used to detect the viral DNA. The research was submitted and approved by the Research Ethics Committee of FCM/Unicamp and the TCLE provided and signed by all participants. The data obtained were tabulated, organized and stored in Excel Program spreadsheets and submitted to statistical analysis. The level of significance for all analyzes was 5%, or p values < 0.05 . Thirteen samples were positive for the presence of HPV DNA (19.12%), seven cases for fresh samples (35%) and six for paraffin samples (12.5%). Among fresh samples ($n=20$), the majority of the positive cases consisted of men, white and married, with a mean age of 53.3 years. As to the localization, 71.4% of the tumors were larynx, classified as moderately differentiated and presented in staging stage IV, with surgery, chemo and radiotherapy as therapeutic procedures. All had a history of smoking and 85.5% of alcoholism. The paraffined samples ($n=48$), showed the mean age of 68.5 years. The majority (83.3%) were man, married (66.6%) and white. In a 50% of the cases, the region most affected was the larynx and 83.3% as moderately differentiated. Regarding staging, 50% were classified in stage III, presenting tumor resection surgery as the most used therapeutic measure. All reported smoking and 66.6% alcohol consumption. The proportion of HPV positive was higher among the adult population and the histopathological findings showed the presence of cells with koilocytosis in both samples. The HPV virus DNA was more prevalent in laryngeal and oral cavity neoplasms, whose tissues were moderately differentiated. The late diagnosis and the beginning of treatment in advanced stages of the disease indicate the need to plan early intervention and/or educational actions with the purpose of reducing the negative effects of events that may occur the disease progression, allowing the possibility of cure and improvement of the quality of life of these patients.

Key words: Aged, Head and Neck Neoplasms, Oncogenic Viruses, *Papillomaviridae* (HPV), Tumor Virus Infections.

RESUMEN

Incluso con modalidades terapéuticas avanzadas, el carcinoma de células escamosas aparece como responsable del aumento de la tasa de mortalidad de la mayoría de los pacientes diagnosticados con tumores de cabeza y cuello. Tumores de cabeza y cuello asociados al VPH se comportan de forma diferente a los demás. La replicación del VPH se produce en el núcleo de las células escamosas y su ciclo de vida está directamente relacionado con el programa de diferenciación celular de la célula huésped. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la prevalencia del virus del papiloma humano (VPH) en las biopsias de tejidos de cáncer, obtenido de pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Fueron seleccionados un total de sesenta y ocho biopsias de tejidos frescos y parafinados. Se utilizó de técnicas de biología molecular, tal como la reacción en cadena de la polimerasa de tipo anidada (*nested-PCR*) para la detección de ADN viral. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la FCM/Unicamp y el consentimiento informado proporcionado, firmado por todos los participantes. Los datos obtenidos fueron tabulados, organizados y almacenados en hojas de cálculo del programa de Office Excel y analizados estadísticamente. El nivel de significancia para todos los análisis fue del 5% o $p < 0,05$. Trece muestras fueron positivas para la presencia de ADN de VPH (19,12%), siete casos para las muestras frescas (35%) y seis para las muestras embebidas en parafina (12,5%). Entre las muestras frescas ($n = 20$), la mayoría de los casos positivos eran hombres, blancos y casados, con una edad media de 53,3 años. En cuanto a la ubicación, 71,4% de los tumores fueron laríngeos, clasificados como moderadamente diferenciados y se presentaban en el estadio IV, con la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia como procedimientos terapéuticos. Todos tenían un historial de tabaquismo y el 85,5% de consumo de alcohol. Las muestras incluidas en parafina ($n = 48$) mostraron una media de edad de 68,5 años. La mayoría (83,3%), formado por hombres, casados (66,6%) y blancos. En el 50% de los casos la zona más afectada fue la laringe y el 83,3% moderadamente diferenciados. En cuanto a la estadificación, 50% fueron clasificados como estadio III, siendo la cirugía de resección del tumor la medida terapéutica más utilizada. Todos informaron de tabaquismo y el 66,6% alcoholismo. La proporción de HPV positivo fue mayor entre la población adulta, y los hallazgos histopatológicos mostraron la presencia de células con coilocitosis en ambas muestras. El ADN del virus VPH fue más prevalente en neoplasias de laringe y cavidad oral, cuyos tejidos se presentaban como moderadamente diferenciados. El diagnóstico tardío y el inicio del tratamiento en etapas avanzadas de la enfermedad, indican la necesidad de planificación de acciones de intervención y/o educativas precoces, con la finalidad de disminuir los efectos negativos de eventos que puedan ocurrir con el avance de la enfermedad, permitiendo la posibilidad de curación y la mejora de la calidad de vida de estos pacientes.

Palabras clave: Anciano, Neoplasias de Cabeza y Cuello, Virus oncogénicos, *Papillomaviridae* (HPV), Infecciones tumorales por virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Infecção pelo HPV e integração do DNA do HPV ao DNA da célula hospedeira infectada.

Figura 2 - Representação esquemática do genoma circular do HPV-16 que mostra a localização dos genes precoce (E) e tardio (L1 e L2) e da região longa de controle (LCR).

Quadro 1 - Representação esquemática das principais funções dos genes E e L do papilomavírus humano (HPV).

Quadro 2 - Estadiamento de tumores de cabeça e pescoço.

Gráfico 1 – Grupos farmacológicos utilizados por pacientes adultos e idosos com a presença do DNA do vírus HPV.

Artigo 2

Figure 1 - Human papillomavirus (HPV) type 16 of three head and neck squamous cell carcinoma specimens. (HE, 20x).

Figure 2 - This field shows typical koilocytosis with reactive nuclei, increased and separate deep characteristic halo of cytoplasm by a neatly condensed edge (Fig 1C, HE, x40).

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

TABLE 1 - List, sequences and product size of primer pair used in PCRs.

TABLE 2 - Characteristics socio-demographic, clinical, histopathological and therapeutic data in 68 patients with HNSCC - fresh and paraffin-embedded samples.

TABLE 3 - Socio economic characteristics of patients with HNSCC grouped by the presence of positive HPV.

TABLE 4 - Clinical, histopathological and therapeutic data of adults and elderly with head and neck cancer grouped by presence of HPV positive.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAISM - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher Hospital - Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti

CEC - Carcinoma espinocelular

CECCP- Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço

CID-10 - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde - versão 10

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etileno di-amino tetra acético

EPC - Equipamento de proteção coletiva

EPI - Equipamentos de proteção individual

FCM - Faculdade de Ciências Médicas

FFPE- *Formalin-fixed paraffin-embedded*

HC - Hospital de Clínicas

HNSCC - *Head and Neck Squamous Carcinoma Cell*

HPV - Papilomavírus humano

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IMC - Índice de Massa Corporal

kDa - kilodalton – unidade de massa atômica

Kg - Quilogramas

LCR - *Long Control Region*

µl - Microlitro

ml - Mililitro

MS - Ministério da Saúde

mg - Miligrama

MG - Minas Gerais

N-PCR - Reação em cadeia da polimerase tipo *Nested*

NK- Células *Natural Killer*

NRs - Normas Regulamentadoras de Segurança no Trabalho

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF's - *Open Reading Frames*

ORL - Otorrinolaringologia

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

p21- Proteína 21

p53- Proteína 53

pRb - Proteína supressora tumoral de retinoblastoma

Primer - Oligonucleotídeos iniciadores

p-value - Valor de p

q.s.p - Quantidade suficiente para

SCC - *Squamous Carcinoma Cell*

SP - São Paulo

SUS - Sistema Único de Saúde

Taq - *Thermus aquaticus*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE - Tris-EDTA

TNM - Sistema TNM de Classificação de tumores, onde T= tumor primário, N= linfonodo, M=metástase

UMA - Unidade Maço Ano

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

UICC - *Union for International Cancer Control*

UV - Ultravioleta

V - Volts

VLP - *Virus-like particle*

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

λ - Lambda

$^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius

% - Símbolo de porcentagem

μ - micro

® - Marca registrada

$5' \rightarrow 3'$ - Sentido de transcrição

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32
3. Metodologia	33
3.1. Metodologia do Artigo 1.....	33
3.1.1. Desenho de estudo.....	33
3.1.2. Seleção dos estudos.....	33
3.1.2.1. Critérios de inclusão.....	33
3.1.2.2. Critérios de exclusão.....	33
3.2. Metodologia do Artigo 2.....	34
3.2.1. Desenho do estudo.....	34
3.2.2. Unidade amostral.....	34
3.2.3. Variável de estudo.....	34
3.2.4. Variável de controle.....	34
3.2.5. Variáveis explanatórias.....	34
3.2.5.1. Variáveis sociodemográficas.....	34
3.2.5.2. Variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas.....	35
3.2.6. Seleção da amostra.....	36
3.2.6.1. Critérios de inclusão.....	36
3.2.6.2. Critérios de exclusão.....	36
3.2.7. Coleta de dados.....	37
3.2.7.1. Instrumentos de coleta de dados.....	37
3.2.7.2. Cuidados laboratoriais.....	38

3.2.7.3. Biossegurança.....	39
3.3. Análise estatística.....	40
3.4. Considerações éticas.....	40
4. Resultados.....	41
4.1. Artigo 1.....	42
4.2. Artigo 2	60
5. Discussão geral.....	91
6. Conclusão.....	97
7. Referências.....	100
8. Anexos.....	106
Anexo 1 - Aprovação da pesquisa pela Plataforma Brasil.....	106
Anexo 2 - Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	107
Anexo 3 - Aprovação da emenda da pesquisa para utilização de amostras parafinadas pela Plataforma Brasil.....	110
Anexo 4 - Aprovação da emenda da pesquisa para utilização de amostras parafinadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	111
Anexo 5 - Ficha clínica elaborada para a pesquisa para a coleta de dados em prontuários médicos.....	114
Anexo 6 - Autorização da Revista brasileira de Clínica Médica para incluir o Artigo 1 na Tese.....	115
Anexo 7- Declaração de não infringir a lei autoral.....	116
Anexo 8 - Comprovante de publicação do Artigo 1 na Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica.....	117
Anexo 9 - Comprovante de submissão do Artigo 2 à Revista Head & Neck.....	118
Anexo 10- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	120

1.INTRODUÇÃO

No Brasil a incidência de câncer de cabeça e pescoço é a maior de todos os países da América do Sul. Dentre eles, o câncer de cavidade oral é considerado o quinto mais incidente no mundo, sendo que a mortalidade causada por ele atinge grandes proporções¹. Normalmente essa doença atinge mais os homens (3:1), e a partir dos 55 anos de idade essa proporção tende a aumentar de maneira importante². Ele atinge principalmente adultos por volta dos 50 anos de idade, e também idosos, dos 60 aos 70 anos^{3,4}. Recentemente tem sido observada uma maior incidência em mulheres acima dos 70 anos e em jovens não fumantes e não etilistas⁵.

As neoplasias da boca representam de 3 a 5% de todas as neoplasias, sendo que dessas 90 a 95% se constituem de carcinomas espinocelulares (CEC)^{2,3,6}. Os principais locais em que se encontra o carcinoma de células escamosas na boca são a língua e o assoalho⁵.

A literatura tem destacado a importância do papel do tabaco e do consumo de álcool na carcinogênese oral, mas quase 20% dos casos têm mostrado etiologia desconhecida, mostrando que outros fatores, incluindo algumas infecções virais, podem ter um papel importante na carcinogênese^{2,3,4,5,6}. Há também fatores genéticos que predisõem ao desenvolvimento de neoplasias orais, bem como a relação entre o câncer de boca e baixos níveis socioeconômicos, com a má higiene oral e o uso de próteses dentárias mal adaptadas^{2,5,6}.

A primeira evidencia de que o papilomavírus humano (HPV) tinha relação com câncer veio do estudo da epidermodisplasia verruciforme. Em 1974, Hausen *et al.* iniciaram uma série de estudos que levaram ao desenvolvimento de pesquisas que relacionaram o HPV ao câncer de colo de útero⁷. Em 1987, Syrjänen *and cols.* encontraram uma possível relação entre o câncer oral e o HPV por meio da observação de alterações citológicas nas lesões orais semelhantes às que são encontradas no câncer de colo de útero induzidas pelo HPV^{3,8}. No entanto, a

prevalência da presença do HPV nas lesões de CEC varia na literatura, de 20 a 50%⁵. Porém, não há muitos estudos no Brasil sobre esse assunto.

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*, tem simetria icosaédrica, seu genoma é constituído por um DNA de fita dupla, circular de aproximadamente 8000 pares de bases (pb). Medem cerca de 55 nm de diâmetro, não são envelopados e são incapazes de codificar as proteínas responsáveis por sua replicação^{8,9}.

Foram identificados pelo menos 150 tipos de HPV, e podem ser classificados como: cutâneos e mucosos, devido ao seu tropismo por essas células. Os cutâneos causam verrugas não genitais, enquanto os mucosos podem ser classificados como sendo vírus de alto risco, como os tipos 16, 18, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, de risco intermediário, como o 31, 33 e 35 e de baixo risco como o 6, 11, 42 e 44. Os de alto risco são muito associados à formação de carcinomas espinocelulares^{8,10}. Dos vários tipos de HPV existentes, vários deles foram associados a lesões orais, incluindo alguns que não costumam ser encontrados em lesões genitais, como os tipos 1, 4, 7, 13, 40, 55, 57, 69, 72 e 73^{8,11}.

O vírus acessa a camada de células basais através de abrasões e microulcerações, se desenvolvendo no epitélio escamoso da pele e membranas mucosas. Nas camadas baixas da epiderme se encontra uma menor transcrição do DNA viral, que é o que mantém um reservatório viral para as próximas divisões celulares, e vai aumentando nas camadas superiores^{8,11}. **(Figura 1)**

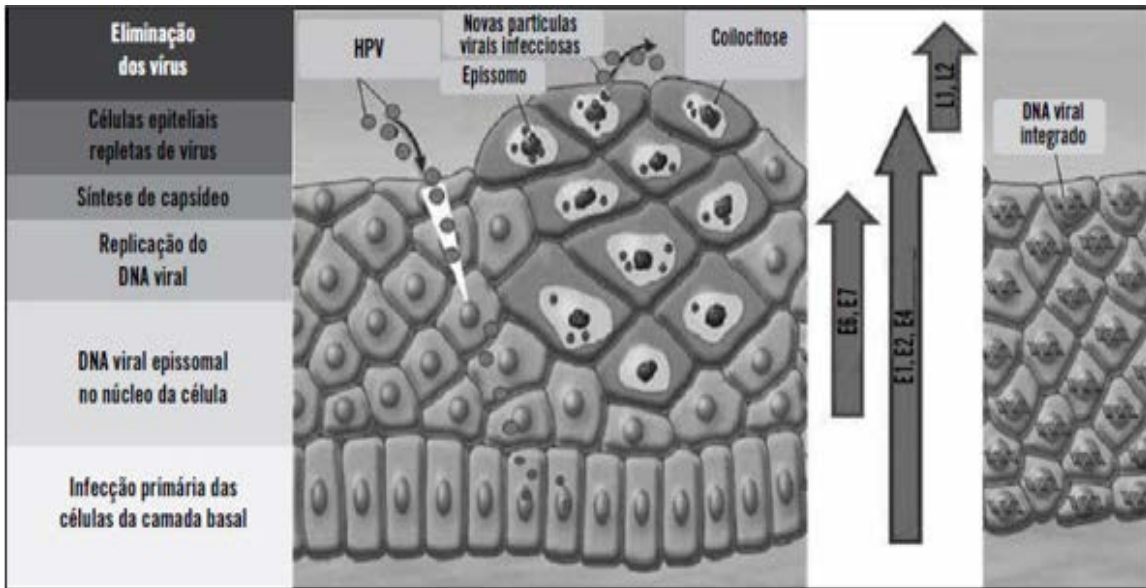


Figura 1 - Infecção pelo HPV e integração do HPV ao DNA da célula hospedeira infectada.

Fonte: Ferraro⁸, pag. 455.

O genoma do vírus HPV é dividido em três regiões principais sendo uma região não codificadora denominada “LCR” (*Long Control Region*) e duas sequências codificadoras de proteínas, chamadas de Regiões Abertas de Leitura ou ORFs (*Open Reading Frames*). A primeira região contém as sequências de DNA fundamentais para regular a replicação e transcrição viral tanto por meio dos genes virais quanto dos genes celulares; enquanto as outras duas regiões são codificadoras de proteínas e se classificam de acordo com seu momento de expressão no ciclo de vida celular do vírus em precoce ou “E” (*Early*), e tardia ou “L” (*Late*) e são restritas a uma das fitas do DNA viral^{12,13}. **(Figura 2)**

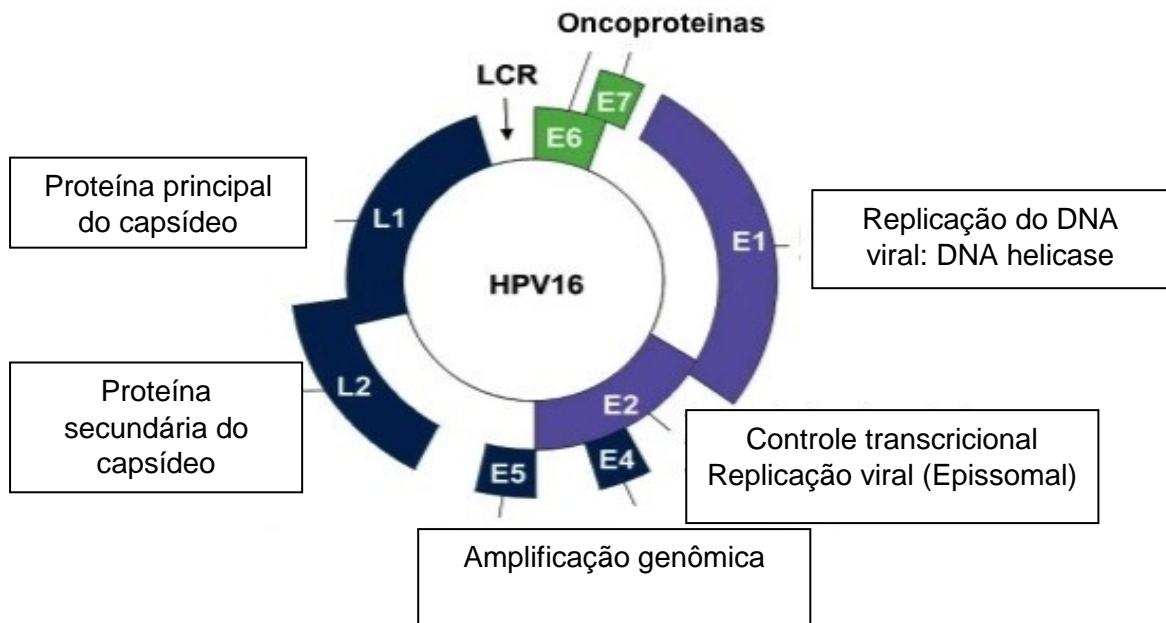


Figura 2 - Representação esquemática do genoma circular do HPV-16 que mostra a localização dos genes precoce (E) e tardio (L1 e L2) e da região longa de controle (LCR).

Fonte: D´Abramo, Archambault, 2011, pag. 82, adaptado pela autora.

A região “E” é composta por 4000 pb, contém os genes precoces que codificam até oito proteínas não estruturais: E1 e E2 responsáveis pelo controle da replicação do DNA epissomal e da transcrição viral, respectivamente; E4 envolvida na maturação e liberação das partículas virais e interação com o citoesqueleto, dando início à formação dos coilócitos nas células epiteliais; E5 envolvida na inibição da apoptose e no estabelecimento da infecção persistente e E6 e E7, consideradas oncoproteínas, envolvidos na proliferação e transformação celular e responsáveis pela progressão do ciclo celular e da replicação do DNA viral. As proteínas E3 e E8 foram descritas em alguns tipos de HPV, porém suas funções permanecem desconhecidas^{13,14,15,16}. **(Quadro1)**

Quadro 1 - Representação esquemática das principais funções dos genes E e L do papilomavírus humano (HPV).

Genes	Proteínas	Função
Precocce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da transcrição e replicação
	E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardio	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

Fonte: Souto¹¹, pag.156, adaptado pela autora.

A região “L”, com 3000 pb, é responsável por codificar as proteínas estruturais que constituem o capsídeo viral, L1 e L2^{13,16}. Este capsídeo é composto por 360 cópias da proteína L1, que possui peso molecular de 54 a 458 kDa e representa aproximadamente 90% da partícula viral, organizadas em 72 capsômeros ou pentâmeros, dispostos de forma icosaédrica. A proteína secundária L2, de peso molecular entre 68 a 76 kDa, fica localizada nos vértices do capsídeo^{13,17,18}.

Entre essas duas regiões (E e L) encontra-se a região longa de controle (LCR), que mantém o controle da transcrição viral sem codificar proteínas^{8,9,11}. As ORFs E1, E2, L1 e L2 são as sequências de DNA mais conservadas entre todos os tipos de HPVs¹⁹.

Logo após a infecção viral, a região E se expressa codificando as proteínas envolvidas na indução e na regulação da síntese de DNA viral. A transcrição dos genes E1 e E2 causam repressão dos genes E6 e E7. Para haver integração do genoma viral ao do hospedeiro é preciso que ocorra uma quebra no genoma viral, sendo que a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. Com a quebra há uma perda de função desses dois genes, sendo que ocorre uma desregulação de E6 e E7, que passam a se ligar respectivamente às proteínas p53 (que regula a

passagem pelas fases G1/S e G2/M do ciclo celular, auxiliando também o início de apoptose) e à pRb (proteína retinoblastoma), inibindo essas proteínas reguladoras do ciclo celular e favorecendo a proliferação celular desorganizada, resultando no crescimento de um tumor^{8,10,11,20}.

A proteína pRb controla o momento exato em que as células decidem entrar no ciclo celular e replicar seu DNA, enquanto a proteína p53 é um fator de transcrição e tradução celular que controla os genes de reparação do DNA e apoptose celular. Ela é produzida e degradada pela via da ubiquitina, outra proteína responsável por marcar proteínas indesejáveis. Danos causados pelo vírus HPV ao DNA celular impedem a ubiquitinação impossibilitando a reparação celular e levando à formação tumoral. A instabilidade genética pode ser ainda maior quando as proteínas virais E6 e E7 se ligam à múltiplas proteínas do hospedeiro como a Bak e a p21, conferindo resistência à apoptose²¹. Desta forma, os efeitos causados pelas proteínas precoces virais acabam por favorecer a proliferação celular descontrolada levando à imortalização, regularização da diferenciação celular com suscetibilidade à metástase e diminuição da vigilância imunológica, aumentando a chance de uma transformação maligna ocorrer²².

Pelo fato do vírus HPV não provocar a morte da célula infectada, ele não é reconhecido pelo sistema imune, permanecendo isolado dentro do queratinócito infectado¹⁰. O desenvolvimento do câncer associado ao vírus pode ocorrer depois de um longo período dessa interação, e o risco do seu desenvolvimento aumenta se o indivíduo tiver algum déficit em seu sistema imunológico.

Nos tumores de cabeça e pescoço, a infecção pelo vírus HPV está associada ao desenvolvimento das neoplasias localizadas, principalmente, nas regiões de orofaringe, amígdala e base de língua. As taxas de incidência têm sido maiores entre a população de adultos jovens em decorrência das mudanças no comportamento sexual, cuja presença do DNA viral pode ocorrer em 70% dos tumores de orofaringe²³.

Os vírus HPV de alto risco encontrados na cavidade oral são os mesmos encontrados no câncer de colo de útero. A presença na mucosa oral dos tipos anogenitais HPV-16 e HPV-18 pode indicar a prática de sexo oral, o que a torna um fator de risco para o desenvolvimento de lesões e câncer nesse local^{5,10}.

Dos estudos realizados até o momento, não houve comprovação de que o vírus HPV seja responsável por gerar as neoplasias da boca por si só, mas a literatura a respeito já considera que ele pode contribuir para o aparecimento dessa doença, principalmente em indivíduos não etilistas e não tabagistas. De acordo com alguns estudos, os casos de câncer de boca correlacionados ao HPV são associados à idade mais baixa, predominância do sexo masculino e comportamento sexual de risco^{4,5,7}. A maioria dos CEC de cabeça e pescoço (CECCP) relacionados ao HPV é causada pelo tipo 16, o mesmo associado ao câncer de colo de útero^{4,8}.

Em contrapartida, os tumores HPV-positivos são clinicamente distintos dos HPV-negativos quando se diz respeito às suas diferenças etiológicas principalmente em relação à resposta ao tratamento e ao desfecho de sobrevivência e estudos clínicos estão sendo realizados para melhor compreensão deste processo²¹.

Os dois fatores de risco que colocam um indivíduo em risco de câncer orofaríngeo - tabagismo e presença do vírus HPV - também são os fatores mais importantes para determinar a sobrevivência do paciente. Isto ocorre provavelmente porque esses fatores determinam o perfil genético desses cânceres e de como eles respondem ao tratamento²⁴.

No estudo clínico randomizado, conduzido por Gillison e colaboradores²⁴ comparando a radioterapia de fracionamento acelerado, foi realizada uma análise retrospectiva da associação entre a presença do HPV tumoral e a sobrevivência em 323 pacientes com carcinoma de células escamosas orofaríngeas nos estágios III e IV de estadiamento. Destes, 206 eram tumores HPV-positivos e 117 HPV-negativos. Os dados mostraram que, nos três anos após o tratamento radioterápico, 82% dos pacientes com tumores HPV positivos ainda estavam vivos, quando comparados aos

57 por cento dos pacientes com tumores HPV-negativos, e as taxas de recaída do câncer para os grupos, no mesmo período, foram de 43% e 74%, respectivamente.

Os pesquisadores determinaram que a presença de HPV em tumores representava a maior parte da diferença na resposta terapêutica e na sobrevivência entre pacientes com tumores HPV positivos e HPV-negativos, enquanto fatores como idade mais jovem, raça branca, melhor nível de energia, ausência de anemia e tumores menores eram responsáveis por apenas cerca de 10% da diferença.

A história pregressa de tabagismo surgiu como o segundo maior preditor independente de sobrevivência e recaída de câncer em pacientes com câncer orofaríngeo. O risco de recaída de câncer ou morte aumentou em um por cento para cada ano adicional de tabagismo (um ano-maço é equivalente a fumar uma embalagem por dia por um ano). Os pesquisadores descobriram que, aos três anos, cerca de 93 por cento dos pacientes com tumores positivos para HPV que nunca tinham fumado ou eram fumantes leves estavam vivos, quando comparados aos 70% dos pacientes com tumores HPV-positivos que eram fumantes e aos 46 % dos pacientes fumantes com tumores HPV-negativos²⁴.

Atribui-se ao tabagismo e etilismo um risco de desenvolver câncer de aproximadamente 65% e quando a combinação entre esses dois fatores é observada, este risco se torna ainda maior²³.

Levantamentos realizados pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) nos anos de 2006 e 2012 (Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - LENAD) estimaram que 11,7 milhões de pessoas seriam dependentes de álcool no país e revelaram um crescimento de 20% do consumo frequente do álcool entre os dois estudos quando 45% dos entrevistados revelaram beber com regularidade sendo 60% dos indivíduos na região Sudeste, 56% no Centro-Oeste, 55% no Sul, 48% no Nordeste e 36% no Norte²⁵. Dados do Relatório Brasileiro sobre drogas mostrou que a população adulta nas faixas etárias correspondentes a 35 - 44 anos, 45 - 49 anos e idosos acima de 60 anos cerca de 55%, 46% e 32%, respectivamente, fazem uso de bebida alcoólica²⁶. Turatti²⁷ e colaboradores, em 2012, encontraram resultados superiores ao estudo nacional tendo 66,2% dos adultos e 41,3% dos idosos que relataram consumir quantidades maiores de bebidas alcoólicas.

A mortalidade por câncer bucal corresponde a menos de 30% dos casos novos, o que significa um prognóstico razoável. A sobrevida média estimada em cinco anos é de cerca de 60% nos países desenvolvidos, e de 40% naqueles em desenvolvimento. A média mundial estimada é de 46%, conforme os estudos da Organização Mundial de Saúde²⁸. Estudos apontam que o hábito de fumar e beber estabelece um sinergismo entre esses dois fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. O fumo é responsável por cerca de 42% dos óbitos por essa neoplasia.

Já o etilismo constante corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos. As taxas de mortalidade por câncer da cavidade oral apresentam um declínio na população masculina na maioria dos países. Em mulheres, esse comportamento ainda não pode ser observado, uma vez que o início do uso do tabaco pelas mulheres foi posterior ao dos homens. Contudo, as taxas de incidência para câncer da cavidade oral relacionado à infecção pelo HPV, como amígdala, base da língua e orofaringe, aumentam entre adultos jovens em ambos os sexos. Parte desse aumento pode ser atribuído a mudanças no comportamento sexual. A detecção precoce pela inspeção visual seja ela feita pelo próprio indivíduo ou por dentistas e médicos, pode descobrir anormalidades pré-malignas do câncer da cavidade oral. Quando diagnosticado precocemente, esse tipo de câncer apresenta bom prognóstico^{23,29}.

Investir em ações preventivas de controle aos fatores de risco e na capacitação dos profissionais de saúde são as melhores alternativas para diminuir a incidência e a mortalidade da doença. Exames clínicos minuciosos que possam identificar lesões precursoras ou em fases iniciais do câncer aumentam a possibilidade de ter um tratamento menos traumático e com maiores chances de sobrevida²³.

Clinicamente, o câncer de boca é mais frequente em indivíduos do sexo masculino e da faixa etária acima dos 50 anos, apesar do acentuado aumento da incidência nas mulheres e em jovens. A sua confirmação diagnóstica é possível por meio de biópsia e análise histopatológica. Entre seus principais fatores de risco estão o fumo e o álcool, associados ou não ao trauma crônico, a má higiene oral, o baixo consumo de caroteno e de frutas cítricas, além da história familiar de câncer,

determinando a presença de lesões pré-malignas como a leucoplasia e a eritroplasia e o carcinoma *in situ*, aliado ao diagnóstico tardio da doença^{30,31,32}.

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças em sua versão 10 (CID-10)³³, o câncer bucal faz parte de um grupo de tumores conhecidos como neoplasias malignas de lábio, cavidade oral e faringe, a saber:

C00 - Neoplasia maligna do lábio, C01 - Neoplasia maligna da base da língua, C02 - Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da língua, C03 - Neoplasia maligna da gengiva, C04 - Neoplasia maligna do assoalho da boca, C05 - Neoplasia maligna do palato, C06 - Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca, C07 - Neoplasia maligna da glândula parótida, C08 - Neoplasia maligna de outras glândulas salivares maiores e as não especificadas, C09 - Neoplasia maligna da amígdala, C10 - Neoplasia maligna da orofaringe, C11 - Neoplasia maligna da nasofaringe, C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme, C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe, C14 - Neoplasia maligna de outras localizações e de localizações mal definida, do lábio, cavidade oral e faringe

O prognóstico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço depende da área comprometida e do estadiamento clínico feito por meio do sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos, preconizado pela *Union for International Cancer Control (UICC)*³⁴.

A classificação clínica do tumor obedece a diferentes variáveis, como: localização, tamanho, invasão direta e linfática, metástases à distância, diagnóstico histopatológico, produção de substâncias, manifestações sistêmicas, duração dos sinais e sintomas, sexo, idade do paciente, dentre outros. Por conseguinte, a necessidade de se classificar os casos de câncer em estágios está na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quanto à localização ou disseminação da doença³⁴. Faz-se uso de símbolos alfa-numéricos onde (T) corresponde às características do tumor primário, (N) às características dos linfonodos da cadeia linfática em que o tumor se localiza e (M) à presença ou ausência de metástases à distância. Recebem graduações numéricas (0,1, 2, 3, 4) e subclassificações alfabéticas (a, b, c) de modo a expressar o nível de evolução do tumor e dos

linfonodos comprometidos. O símbolo X é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada³⁵. A saber:

T= tumor primário; TX= tumor não pode ser avaliado; T0= não há evidências de tumor primário, Tis= carcinoma “*in situ*”; T1= tumor de até 2 cm em sua maior dimensão; T2= tumor maior que 2 cm até 4cm em sua maior dimensão; T3= tumor maior que 4cm em sua maior dimensão e T4= tumor que invade estruturas adjacentes, como músculos e ossos. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios I, II, III e IV e ainda podem ser subclassificadas em A e B para expressar o nível da evolução da doença. Desta forma, de acordo com o **Quadro 2**, temos os seguintes tipos de estadiamento para o câncer de cabeça e pescoço:

Quadro 2 - Estadiamento de tumores de cabeça e pescoço.

Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio II	T2 N0 M0
Estágio III	T1 N1 M0, T2 N1 M0 T3 N0 M0, T3 N1 M0
Estágio IVA	Qualquer T N2 M0 T4a N0 M0, T4 N1 M0, T4 N2 M0
Estágio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estágio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

Fonte: MS³⁴, pag 27-28, adaptado pela autora.

São indicadores de prognósticos desfavoráveis aqueles tumores primários maiores do que 3 cm; a presença de linfonodo metastático cervical; a recidiva

tumoral; a invasão perineural; a invasão mandibular; as lesões histologicamente pouco diferenciadas e as lesões de comissura³².

Destarte, as lesões iniciais e aquelas que estão localizadas nas porções mais anteriores com estadiamento I e II têm um prognóstico melhor quando comparadas às lesões avançadas (III e IV). Quanto ao tratamento utilizado na terapia oncológica podem ser do tipo cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou associação de terapias.

Em relação à classificação histopatológica dos CECs, no ano de 2005 foi proposto pela OMS^{36,37} um agrupamento das neoplasias malignas baseadas no grau de diferenciação celular, permitindo classificá-las em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciados. A saber:

Grau 1 - Bem diferenciado: as características histológicas e citológicas são muito parecidas com as do revestimento epitelial escamoso da mucosa oral. Existem diferentes proporções de células basais e escamosas com pontes intercelulares; a ceratinização é uma característica proeminente; são observadas poucas figuras mitóticas e mitoses atípicas ou células epiteliais multinucleadas são extremamente raras; o pleomorfismo nuclear e celular é mínimo.

Grau 2 - Moderadamente diferenciado: com características intermediárias entre bem diferenciadas e mal diferenciadas. Em comparação aos bem diferenciados, estes são poucos ceratinizados, mais pleomorfismo nuclear e celular; há mais figuras mitóticas e algumas são anormais na forma; pontes intercelulares são menos visíveis.

Grau 3 - Pouco diferenciado: ligeira semelhança ao epitélio escamoso estratificado normal da mucosa oral. Raramente a ceratinização está presente e as pontes intercelulares são extremamente escassas; a atividade mitótica é frequente e mitoses atípicas podem ser facilmente encontradas; pleomorfismo celular e nuclear são evidentes e as células multinucleadas podem ser frequentes.

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um ótimo método para diagnóstico da infecção por HPV nos tecidos humanos, sendo a técnica mais

sensível para a detecção do DNA desse vírus^{4,8,9,10}. Consiste em três etapas, que são realizadas em um aparelho denominado de termociclador. A primeira etapa é a **desnaturação**, que ocorre numa temperatura de aproximadamente 94°C por 10 minutos, para que ocorra a separação da dupla fita de DNA em fitas simples. Na segunda etapa, que ocorre o **anelamento** sob a temperatura de 55°C por 1 minuto, onde os primers se anelam especificamente com as sequências complementares do DNA alvo na fita simples. A terceira etapa ocorre a 72°C por 40 segundos, na qual se dá a **extensão**, aonde os nucleotídeos vão se ligando a sequência complementar na fita molde, gerando uma nova fita de DNA complementar à original. Por último ocorre a extensão final, a 72°C durante 4 minutos. A partir disso ocorrem vários desses ciclos para desenvolver a amplificação do DNA original, ou seja, a formação de várias novas fitas do DNA⁴.

Diante do exposto, o presente trabalho espera contribuir ao estudo sobre o câncer de cabeça e pescoço, conhecendo os principais fatores relacionados à mortalidade, especialmente entre os idosos atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp. Novas investigações sobre a presença ou não do papiloma vírus em tecidos tumorais de cabeça e pescoço devem ser realizadas com o intuito de desenvolver programas de prevenção, formas de diagnósticos e propor novos tratamentos a fim de aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes.

2.OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

2.1. Objetivo Geral:

- Identificar em amostras de biópsias cirúrgicas e parafinadas de carcinoma espinocelular a presença do vírus HPV, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e *nested*-PCR) em pacientes adultos e idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço;
- Relacionar a presença ou não desse vírus nas amostras de neoplasias, considerando os outros fatores de risco a que o paciente esteve submetido durante a vida, que foram obtidos através das informações contidas no prontuário médico do paciente no Hospital de Clínicas da Unicamp.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar a amostra segundo as características sociodemográficas, aspectos tumorais como o tipo histopatológico, a localização anatômica, o estadiamento e o tratamento do tumor.
- Identificar a frequência dos fatores de risco associados a etiologia do câncer de cabeça e pescoço;

3.METODOLOGIA

3.1. Metodologia do Artigo 1

3.1.1. Desenho do estudo

Foi realizada revisão da literatura sobre os aspectos da importância de diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos.

3.1.2. Seleção dos estudos

Os estudos foram selecionados de acordo com as evidências científicas nas ciências básicas e nos estudos clínicos utilizando os seguintes descritores: “carcinoma de células escamosas/diagnóstico, “detecção precoce de câncer”, “idoso”. As buscas foram realizadas nas bases de dados: MEDLINE (via PubMed), Lilacs e SciELO. A seleção dos estudos foi realizada de acordo com os tópicos de interesse: 1) Conhecimento sobre a doença, 2) Fatores de risco envolvidos, 3) Detecção precoce do câncer bucal e 4) Envelhecimento.

3.1.2.1. Critérios de inclusão

Incluídos estudos publicados em inglês e português. Foram consideradas publicações a partir do ano 2000 até 2015. O artigo foi revisado por todos os autores antes de sua submissão.

3.1.2.2. Critérios de exclusão

Estudos que não contemplavam a temática proposta e que não se enquadravam nos tópicos de interesse delimitado para esta revisão de literatura.

3.2. Metodologia do Artigo 2

3.2.1. Desenho do estudo

Estudo observacional, descritivo e transversal, com as variáveis categóricas abrangendo dados sociodemográficos, clínicos, histopatológicos e terapêuticos. Foram analisados os dados de pacientes adultos e idosos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, investigando a presença de papilomavírus humano.

3.2.2. Unidade amostral

Pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço; homens e mulheres que tinham recebido o diagnóstico de câncer na região de cabeça e pescoço pela primeira vez.

3.2.3. Variável de estudo

Presença do DNA de HPV: sim ou não. Presença do DNA viral na célula tumoral confirmada por PCR.

3.2.4. Variável controle

Tipo de amostra: amostra colhida à fresco e amostra parafinada

3.2.5. Variáveis explanatórias

3.2.5.1. Variáveis Sociodemográficas

- Gênero: sexo referido pelo paciente no momento da admissão ao serviço médico do HC: masculino e feminino.

- Raça: cor de pele referida pelo paciente no momento da admissão ao serviço médico do HC: branca, preta, parda, amarela.
- Idade: número de anos transcorridos desde o nascimento até a data contida no laudo histopatológico. Os valores foram agrupados em quatro faixas: 40-49 anos; 50-59 anos; 60-69 anos; 70-79 anos e 80 ou mais.
- Estado civil: situação conjugal informada pelo paciente e contida nos prontuários médicos e categorizados como: casado, viúvo, divorciado, solteiro e outros.
- Local de origem: foi considerada a cidade onde o paciente residia e não o local de nascimento. Informação contida no sistema de cadastro eletrônico do paciente junto ao HC/Unicamp.

3.2.5.2. Variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas

Foi elaborada uma ficha especialmente para o estudo (**Anexo 5**) utilizando-se as informações contidas no prontuário médico do paciente ou no cadastro eletrônico quando da admissão do paciente ao HC/Unicamp.

- Uso de tabaco: sim ou não. Registro sobre o relato do uso ou não do tabaco ao longo da vida do paciente.
- Uso de álcool: sim ou não. Registro do relato do uso ou não do álcool ao longo da vida do paciente
- Localização do tumor: registro da região anatômica em que se encontrava o tumor.
- Grau de diferenciação: anotado de acordo com o laudo histopatológico emitido por patologista.
- Estadiamento: estágio em que a doença se encontra de acordo com o sistema TNM de classificação de tumores.

- Tratamento: tipo de tratamento utilizado para a doença: cirúrgico, quimioterápico e/ou radioterápico.
- Uso de medicação: registro de todos os medicamentos em uso de acordo com as informações contidas no prontuário médico.
- Doenças relatadas: registro de todas as comorbidades contidas no prontuário médico.
- Escolaridade: número de anos de estudos relatados no prontuário médico: 0-4 anos, 5-8 anos, 9 ou mais.

3.2.6. Seleção da amostra

Foram selecionadas cem amostras entre os anos de 2010 e 2014, de indivíduos adultos e idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp. As amostras à fresco foram provenientes do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC/Unicamp; enquanto as amostras parafinadas foram cedidas pelo Departamento de Anatomia Patológica da FCM/Unicamp.

3.2.6.1. Critérios de inclusão

Foram utilizados somente amostras de indivíduos que tiveram o diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço pela primeira vez. As peças cirúrgicas foram selecionadas com base no diagnóstico histopatológico emitido de carcinoma espinocelular.

3.2.6.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo amostras provenientes de pacientes com recidiva do tumor, ou submetidos a qualquer tipo de transplante anteriormente.

3.2.7. Coleta dos dados

A coleta de amostra de tecido tumoral foi realizada pelos médicos do Ambulatório de Otorrinolaringologia em consultas de rotina e parte deste material nos foi cedida para a utilização em nosso estudo.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp) no período entre 2014 a 2015. Foram extraídos o DNA deste material e realizada a técnica da Reação em cadeia da Polimerase tipo *nested*, para verificar a presença do DNA do vírus HPV.

3.2.7.1. Instrumentos de coleta de dados:

A) Extração de DNA das amostras à fresco: o material biológico proveniente de tecido neoplásico foi previamente aliquotado em tubos estéreis de 1,5ml, tipo Eppendorf e encaminhadas ao Laboratório de Vírus/FCM/Unicamp, sendo armazenados a -80°C e estocados até atingir uma quantidade de amostras que pudessem ser descongeladas para dar início ao processo de extração de DNA. Para tanto, foi utilizado o kit de extração da marca Biopur. Este é composto por reagentes como: Tampão A de Lise, Proteinase K, Tampão B6 de Ligação, Tampão I de Lavagem, Tampão II de Lavagem, Tampão de Eluição e tubos para reação. Primeiramente, foram transferidos 200 μL da amostra, em um tubo de reação de 1,5 mL. Caso o volume da amostra fosse menor que 200 μL , o volume era equilibrado com tampão PBS (1x) ou água destilada para completar o volume final. Foi adicionado 200 μL de Tampão A de Lise e 20 μL de Proteinase K. A mistura foi agitada com o vórtex por 5 segundos e/ou por pipetagem repetitiva (5x). Foi incubado o tubo de reação por 20 minutos, a 56°C , em um termomixer em agitação contínua (650 rpm). A seguir, foi adicionado 400 μL de Tampão B6 de Ligação, misturando-se a amostra por vórtex ou por pipetagem

repetitiva. O tubo Spin foi colocado em um tubo de reação de 2,0 mL. A mistura foi transferida para o tubo Spin, fechando-se, levando-o em seguida para incubação por 1 minuto. A amostra foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e a amostra colocada em novo tubo de reação de 2,0 mL devidamente identificado. Foram adicionados 500 µL de Tampão I de Lavagem ao tubo Spin. O tubo foi fechado e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm, descartando-se o filtrado. Logo após foram adicionados 800 µL de Tampão II de Lavagem e centrifugado por 5 minutos na velocidade máxima para eliminação completa do etanol presente. O tubo Spin foi colocado em um novo tubo de reação de 1,5 mL. Foram adicionados 200 µL de Tampão de Eluição pré-aquecido a 56°C. Logo após foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto. A amostra foi centrifugada a 8.000 rpm por mais 1 minuto. O tubo Spin foi descartado e a amostra que foi filtrada, armazenada. As amostras obtidas foram guardadas em freezer a -20°C até o momento de sua utilização.

- B) Extração de DNA das amostras parafinadas: As amostras emblocadas passaram por um processo de desparafinização, a fim de se conseguir um fragmento para a realização da extração de DNA, utilizando-se do Qiagen DNA FFPE *tissue kit*. Após este procedimento as amostras passaram pela reação da beta globina (PCO3 e PCO4) para confirmação da presença de DNA no fragmento. A seguir, foi realizada a amplificação por PCR dessas amostras, e em seguida utilizada a técnica de PCR com primers específicos para os vírus HPV. Em seguida, houve uma nova amplificação por meio do *nested-PCR*, para verificar a especificidade da amostra em relação ao tipo de vírus.

3.2.7.2. Cuidados laboratoriais

Para evitar contaminação das amostras durante a Reação da PCR, alguns cuidados foram tomados: todas as amostras a serem amplificadas

foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi realizada (sala pós-PCR). Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes: a extração de DNA foi feita em uma sala separada e em capela específica (sala 1); a pipetagem dos reagentes foi realizada em capela de fluxo laminar na sala 2; amplificação das amostras na sala 3. Além disso, os conjunto de pipetas, ponteiros e tubos especiais eram de baixa retenção; antes da abertura dos tubos de microcentrífuga, foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar a dispersão dos aerossóis; todo material plástico (ponteiros e tubos de Eppendorf para PCR) utilizado era novo e autoclavado; trocas constantes de luvas foram feitas durante todo procedimento e as mesmas eram descartáveis e livres de talco; lavagem de mãos foram frequentes.

3.2.7.3. Biossegurança

O desenvolvimento do trabalho exigiu que houvesse contato com material biológico (sangue) considerado contaminado, podendo alojar microorganismos e, portanto, ser um agente transmissor de doenças. Conscientes da importância de proteção na manipulação destes materiais, artigos, resíduos e ambientes algumas precauções padrão foram tomadas:

- Uso sistemático de EPIs (equipamentos de proteção individual): luva, gorro, máscara, óculos de proteção e sapato fechado;
- Atenção para riscos ao manipular, preparar, recolher, transportar ou limpar materiais perfurocortantes usados;
- Cuidados ao desprezar material perfurocortante de único uso em contentor adequado (EPC-equipamento de proteção coletiva) e descarte sistematizado de material usado, de acordo com as NRs (Normas Regulamentadoras de Segurança no Trabalho).

3.3. Análise estatística

Os dados obtidos na pesquisa foram tabulados, organizados e armazenados em planilhas do Programa Microsoft® Excel® 2016 MSO. Os resultados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher para avaliar as diferenças entre as taxas de prevalência de HPV dos adultos e idosos das diferentes amostras. As relações entre a presença de HPV e as variáveis sociodemográficas, clínicas, histopatológicas e terapêuticas foram analisadas por modelo de tabulação cruzada e regressão logística. A independência entre variáveis categóricas foi testada com o teste Qui-quadrado de Pearson. Os efeitos de múltiplos fatores na presença de HPV foram determinados usando um modelo de regressão logística sem interação entre variáveis, onde o *odds ratio* (OR) e correspondentes intervalos de confiança de 95% (CI) foram calculados para determinar a magnitude da associação. A significância estatística foi estabelecida no nível de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises estatísticas. Para realizar as análises, utilizou-se a rotina glm do pacote estatístico R, versão 3.3.1 (2016-06-21).

3.4. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp sob o número de protocolo: 15380213.0.0000.5404 na Plataforma Brasil (**Anexo 1**) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (**Anexo 10**)

4.RESULTADOS

Os artigos elaborados atenderam aos objetivos propostos pelo estudo/tese.

- **Artigo 1**

Título: A importância do diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos

Objetivo: realizar um estudo de revisão narrativa referente ao diagnóstico precoce de câncer oral em idosos.

- **Artigo 2**

Título: Presence of human papillomavirus DNA in head and neck squamous cells carcinoma biopsies from adults and elderly patients.

Objetivo: Identificar em amostras de biópsias cirúrgicas e parafinadas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço de pacientes adultos e idosos a presença do vírus HPV, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e *nested*-PCR) em pacientes adultos e idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço.

4.1. Artigo 1.

Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica (**Anexo 8**).

Torres SVS, Sbegue A, Costa SCB. A importância do diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos. The importance of early diagnosis of oral cancer in the elderly. Rev Soc Bras Clin Med. 2016 jan-mar;14(1):57-62.

<http://www.sbcm.org.br/revistas/RBCM/RBCM-2016-01.pdf>

A importância do diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos

The importance of early diagnosis of oral cancer in the elderly

Stella Vidal de Souza Torres¹, Alessandra Sbegue², Sandra Cecília Botelho Costa¹

1 Faculdade de Ciências Médicas Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia.

2 Faculdade de Medicina Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Stella Vidal de Souza Torres

Faculdade de Ciências Médicas Universidade Estadual de Campinas

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária Zeferino Vaz

CEP: 13083-887 – Campinas, SP, Brasil

E-mail: stellavidal@yahoo.com.br

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Mesmo com o avanço das modalidades terapêuticas para o tratamento do câncer, o carcinoma espinocelular oral possui elevadas taxas de mortalidade. Este artigo tem por finalidade revisar e discutir sobre essa questão. **CONTEÚDO:** Grande parte dos casos diagnosticados da doença é detectada em sua fase avançada, em indivíduos de baixa renda, com pouca escolaridade e com limitado acesso aos serviços de saúde. No entanto, esta neoplasia pode ser prevenida através de ações que facilitem a identificação dos principais fatores de risco, que são, em sua maioria, de ordem socioambiental.

CONCLUSÃO: Práticas de prevenção e promoção de saúde que busquem o diagnóstico precoce de lesões suspeitas possibilitam maiores chances de cura e de aumento da sobrevida dos pacientes, especialmente entre os idosos.

Descritores: Carcinoma de células escamosas/diagnóstico; Detecção precoce de câncer; Envelhecimento; Promoção de Saúde; Saúde do Idoso.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Even with the advance of therapeutic modalities for the treatment of cancer, the oral squamous cell carcinoma has high rates of mortality. This article aims to review and discuss about this issue.

CONTENTS: A large part of diagnosed cases of the disease is detected in the advanced stage, in individuals of low income, with little education and limited access to health services. However, this neoplasm can be prevented through actions that facilitate the identification of the main risk factors, which are, in its majority, of socio-environmental causes. **CONCLUSION:** Practices of prevention and health promotion that seek the early diagnosis of suspicious lesions allow greater chances of cure and increased survival of the patients, especially among the elderly.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma/ Diagnosis; Early Detection of Cancer; Aging; Health promotion; Health of the Elderly.

INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, no ano de 2030, ocorram 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas que conviverão com a doença⁽¹⁾. O câncer bucal responde por quase 3% dos casos de câncer no mundo, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) a neoplasia maligna mais comum, correspondendo a aproximadamente 90 a 95% de todas as neoplasias malignas encontradas nesta região.⁽²⁾

No Brasil o câncer oral é preocupante, com alta incidência e mortalidade na população. De acordo com estimativa do INCA (Instituto Nacional de Câncer), ^(3,4) o câncer de cavidade oral representa quase 4% de todas as neoplasias malignas,

sendo o quinto mais incidente entre os homens e o décimo segundo entre as mulheres, e mais prevalente nas regiões Sudeste, Nordeste e Sul. Grande parte dos casos diagnosticados da doença é detectada em sua fase avançada, em indivíduos de baixa renda, com pouca escolaridade e com limitado acesso aos serviços de saúde. No entanto, esta neoplasia pode ser prevenida através de ações que facilitem a identificação dos principais fatores de risco, que são, em sua maioria, de ordem socioambiental, e pela realização de práticas que busquem o diagnóstico precoce de lesões suspeitas, possibilitando, assim, maiores chances de cura e um aumento da sobrevida dos pacientes, especialmente entre os idosos.

O câncer da cavidade oral é mais comum em homens caucasianos na quinta década de vida. O tabagismo, etilismo e algumas infecções virais, como por HPV ou EBV, também são fatores de risco para o desenvolvimento do câncer oral, e já foram demonstrados por vários autores na literatura.^(5,6)

Esse tipo de câncer pode ser detectado simplesmente com visualização da cavidade oral em busca de lesões, sendo um método de baixo custo e que pode ser feito pelo próprio indivíduo. Apesar disso a maior parte dessas neoplasias é diagnosticada nas fases mais avançadas da doença (estágios III e IV).⁽⁷⁾

Costa *et al.*⁽⁸⁾ realizou um estudo em Piracicaba-SP e concluiu que apesar da maioria dos idosos já terem ouvido falar em câncer oral, menos da metade deles sabe como se prevenir. A falta de informação da população geral e dos profissionais de saúde sobre a prevenção dessa neoplasia, principalmente em indivíduos expostos a fatores de risco, atrasa o diagnóstico dessa neoplasia. Isso diminui a eficácia do tratamento e aumenta a gravidade das sequelas secundárias a ele, principalmente relacionadas à deglutição e fonação, além de elevar os índices de mortalidade.⁽⁹⁾

O câncer oral em idosos

Uma das mais altas incidências de câncer de boca e orofaringe do mundo é encontrada no Brasil⁽¹⁰⁾ e a incidência de casos de câncer de boca em indivíduos idosos tem crescido significativamente. Em parte, isso decorre do aumento da longevidade da população brasileira.

Por apresentar um tratamento muitas vezes agressivo, o estado de saúde geral do paciente é sempre levado em consideração. O fato de ser idoso e possuir um diagnóstico de câncer requer uma atenção com relação ao tratamento. Por vezes, ele foi executado de forma paliativa baseado na crença de que o paciente não suportaria a terapia e morreria em sua decorrência, acreditando que o tratamento seria mais agressivo do que a própria lesão^(10,11,12). Entretanto, estudos recentes vêm mostrando o contrário.

Um estudo realizado por Perussi *et al.*⁽¹³⁾ mostrou que não houve diferença entre os grupos de idade quando analisados alguns parâmetros de evolução da gravidade da doença, como indivíduos que morreram antes do início do tratamento e o tempo de sobrevida dos mesmos. No entanto, por ser o câncer um processo marcado pela falta de controle da proliferação celular, existe a indicação de que a evolução da doença pode variar em conformidade com algumas características clínicas ou patológicas. Desta forma, existe a possibilidade de que a evolução dos indivíduos que desenvolvem câncer em idade mais avançada seja diferente dos que são acometidos pela doença quando mais jovens. Deve-se ressaltar ainda que a ausência de complicações associadas ao processo de envelhecimento, além de uma menor prevalência de doenças debilitantes, pode significar uma melhora na evolução da doença nos pacientes mais velhos.⁽⁹⁾

Em outro estudo conduzido por pesquisadores do *Rabin Medical Center*, de Tel Aviv (Israel), mostrou que o comportamento do câncer de boca em pacientes com mais de 75 anos não é diferente das outras faixas etárias além de que o tratamento tem, estatisticamente, o mesmo efeito nesse grupo. Os pesquisadores perceberam que a taxa de sobrevida de 5 anos observada nos pacientes com mais de 75 anos de idade foi maior do que no grupo com menor idade sendo 65% contra 58% no grupo dos mais jovens.⁽¹⁰⁾

A maior dificuldade no tratamento do câncer de boca nos pacientes idosos tem sido o diagnóstico tardio da doença, assim como acontece em qualquer faixa etária de pessoas acometidas por esta patologia. A investigação do perfil e da sobrevivência dos pacientes de acordo com as regiões anatômicas específicas fornece bases científicas para orientar campanhas de prevenção educativas para o diagnóstico precoce e tratamento dessa doença, que quase sempre começa num local de fácil visualização e inspeção para o próprio paciente.⁽¹¹⁾ Uma lesão que

apresenta mais de três centímetros de tamanho já é considerada em fase avançada e, devido ao seu perfil biológico, o carcinoma espinocelular pode, em pouco tempo, atingir esse tamanho. Por esse fato, é importante alertar os pacientes para a realização de exames periódicos feitos por profissionais, bem como o autoexame da cavidade oral com o intuito de observar a presença de sinais que possam ser indicativos de câncer, tais como: aumentos no tecido mucoso; presença de caroços; úlceras ou manchas brancas, vermelhas ou escuras, podendo causar sangramento e dor para que, assim, em casos de suspeita da doença, possam ser realizados exames complementares como a citologia esfoliativa ou a biópsia da lesão no intuito de ser realizado um diagnóstico precoce da doença.

Apesar de serem escassos os estudos associando o perfil dos pacientes conforme o tempo de evolução das lesões, é consenso na literatura que os pacientes diagnosticados em estágio tardio da doença têm maiores índices de mortalidade.⁽¹²⁾ De acordo com Kowalski e Souza,⁽¹⁴⁾ as causas mais importantes no atraso do diagnóstico são a evolução inicial sem sintomatologia, o reduzido conhecimento sobre a doença entre pacientes e profissionais, o medo do diagnóstico e as dificuldades ao acesso médico. O tempo médio que os pacientes demoram a procurar cuidados profissionais varia de três a cinco meses para o câncer bucal.⁽¹⁵⁾

Fatores de risco:

A literatura científica reconhece que os dois principais fatores de risco relacionados ao câncer bucal são: o hábito de fumar e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas. No entanto, outros fatores têm sido associados ao desenvolvimento do câncer de boca e orofaringe, que incluem agentes biológicos, como o papilomavírus humano (HPV), higiene oral precária, história pregressa de neoplasia do trato aerodigestório e exposição à luz ultravioleta em excesso (câncer de lábio).^(1,3,4,7)

Tabaco:

O ato de fumar, durante anos foi interpretado como um estilo de vida. Atualmente, este equívoco foi elucidado pelo entendimento de que o tabagismo

trata-se de uma doença resultante da dependência à nicotina, sendo classificado no Código Internacional de Doenças (CID-10) no grupo de transtornos mentais e de comportamentos decorrentes do uso de substâncias psicoativas. Além disso, as inúmeras substâncias presentes na composição dos produtos do tabaco são fatores causais para cerca de 50 doenças tabaco-relacionadas ao grupo de doenças crônicas como câncer, cardíacas, cerebrovasculares e respiratórias.^(16,17)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer de boca eram tabagistas. O cigarro representa o maior risco para o desenvolvimento dessa doença sendo que seu risco varia de acordo com o consumo, ou seja, quanto mais frequente for o ato de fumar, maiores serão as chances de desenvolver câncer de boca.⁽¹⁷⁾

Para definir a intensidade de tabagismo dos fumantes emprega-se a unidade maço/ano – UMA. Ela determina a quantidade de maços fumados por um determinado tempo, tendo como base a unidade maço/ano, ou seja, o número de maços de cigarros fumados por dia por um ano. De modo que, se um indivíduo fumou um maço ao dia por 10 anos ou dois maços ao dia por cinco anos, ele terá fumado 10 anos/maço.

(Unidade Maço Ano = n° maços por dia x anos que fumou)

Por outro lado, quando se deseja investigar a exposição do indivíduo ao tabagismo levando-se em conta o número de cigarros consumidos por dia, utiliza-se o cálculo da carga tabágica em anos/maço que é calculada de acordo com o número de cigarros consumidos por dia, dividido por 20 (1 maço = 20 cigarros) e multiplicado pelo número de anos que o paciente fumou. Assim, o paciente que fez uso de 30 cigarros por dia durante 15 anos ($30/20 \times 15$) sua carga tabágica será de 22,5 anos-maço.⁽¹⁸⁾

Vale salientar que uma pessoa que possui uma carga tabágica maior do que 20 anos/maço já possui grandes chances de apresentar qualquer patologia associada ao tabaco e que o risco diminui após 15-20 anos de cessação.

É notório que o risco de câncer está aumentado de acordo com o início precoce do tabagismo, da quantidade de cigarros fumados e do número de anos que a pessoa fuma. Assim, o tabaco, além de ser um fator de risco para o câncer, é, também, um importante fator que dificulta o tratamento e o controle das neoplasias em geral.⁽¹⁹⁾

Dados da literatura científica demonstram que o tabagismo após o diagnóstico de câncer ainda não é rotineiramente abordado como uma doença que necessite de tratamento, de modo que a continuidade do hábito contribui para um maior risco de complicações durante o tratamento, diminuição das respostas à radio e quimioterapia, além de possibilitar o agravamento de doenças tabaco-relacionadas. Com isso, pode haver um aumento no risco de recidiva e o surgimento de um segundo tumor primário, ocasionando a diminuição da qualidade de vida do indivíduo e, conseqüentemente, de sua sobrevivência global.⁽¹⁸⁾

Em uma esfera maior, além dos riscos e danos causados à saúde, o tabagismo compromete o desenvolvimento social e econômico, bem como afeta a sustentabilidade ambiental. Em virtude da carga das doenças tabaco-relacionadas terem um grande impacto no sistema de saúde é que a cessação do hábito deve ser estimulada.⁽¹⁷⁾

No entanto, mesmo informados a respeito de ser o tabagismo um fator de risco e de aumento da morbidade durante o tratamento, muitos pacientes permanecem fumando. Dados da literatura explicam que o tabagismo após o diagnóstico de câncer ainda não é rotineiramente abordado como uma doença que necessita de tratamento, uma vez que a dependência nicotínica caracteriza-se pelo uso e necessidade tanto física como psicológica, apesar do conhecimento de seus efeitos prejudiciais.^(16,17,19)

Etilismo:

O risco de desenvolver câncer de boca também está associado ao consumo regular de bebidas alcoólicas.

No Brasil, Leite e Koifman⁽²⁰⁾ encontraram que 59,3% dos pacientes ingeriam bebidas alcóolicas e destes, 69,1% usavam bebidas destiladas. O sítio anatômico esteve relacionado com a ingestão de álcool em consumidores diários, localizando-se principalmente na língua, lábios e assoalho bucal.

O álcool está associado com o aumento da proliferação celular. O consumo de álcool, especialmente etanol, interfere com o reparo do DNA e pode ter um efeito imunossupressor.⁽²¹⁾

Por um mecanismo ainda desconhecido, o álcool é capaz de impossibilitar que as células epiteliais organizem a barreira de permeabilidade, que é fundamentalmente composta por lipídeos e que possui a função de impedir a desidratação e a penetração de agentes externos.^(22,23)

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que um maior acúmulo microbiano decorrente de uma má higiene oral seria capaz de promover uma maior produção de acetaldeído através da metabolização do etanol da saliva, especialmente entre os consumidores de grandes quantidades de álcool. O processo se dá pela conversão do álcool pela enzima álcool-desidrogenase (ADH) em acetaldeído, e este em acetato pela enzima aldeidodesidrogenase (ALDH). O acetato alcança diferentes partes do organismo, podendo ser utilizado na produção de energia ou de outras moléculas através da rota de degradação semelhante à da glicose. No entanto, como a atividade da ALDH é baixa na cavidade oral, pode haver acúmulo de acetaldeído no epitélio bucal.⁽²⁴⁾

Entre as principais espécies envolvidas nesse processo estão a *Candida albicans* e a *Neisseria*, por possuírem alta atividade de ADH e por estarem presentes na mucosa oral de indivíduos alcoolistas.^(25,26,27)

Assim, a produção de acetaldeído e a presença de microorganismos bucais em indivíduos com higiene bucal precária pode explicar a relação entre *status* bucal e risco de desenvolvimento de câncer de boca.^(25,28)

Radiação solar:

A luz ultra-violeta representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer de lábio, já que a incidência aumenta principalmente nas pessoas de pele clara, com ocupações externas e que residam ou trabalhem em áreas rurais.⁽¹⁷⁾

Papilomavírus humano (HPV):

Foi no início da década de oitenta que um estudo conduzido por Syrjänen *et al.*⁽²⁹⁾ sugeriu o envolvimento do HPV com o câncer bucal, quando os autores associaram as alterações celulares encontradas em lesões malignas e pré-malignas da boca às mesmas que ocorriam no câncer de cérvix uterino.

Estas conclusões continuam válidas após anos de investigação sobre o assunto apontando que o HPV parece estar associado a uma proporção de carcinomas orais. Além disso, estudos realizados entre grupos de faixas etárias distintas não mostrou nenhuma diferença significativa na incidência de HPV entre pacientes mais novos e mais velhos, sugerindo um papel semelhante para o HPV em todos os grupos etários.^(30,31)

Lábios, palato, língua, gengiva, úvula, tonsilas e assoalho da boca têm sido os locais de maior predileção do vírus dentro da cavidade oral. O assoalho de boca por ser uma região inundada por saliva propicia a presença de agentes cancerígenos, como o fumo e o álcool e permite maior oportunidade para a ação deletéria viral.^(32,33)

O diagnóstico do papilomavírus humano na mucosa oral pode ser realizado através do exame clínico da lesão, citologia e biópsia, sendo que o aspecto citológico da infecção por HPV caracteriza-se por critérios maiores e menores. O primeiro baseia-se na presença de coilócitos clássicos, halos citoplasmáticos perinucleares e displasias nucleares, enquanto que os critérios menores tem como característica a presença de disceratócitos, metaplasia imatura atípica, macrócitos e binucleação⁽³⁴⁾.

Os métodos usados para a detecção do DNA do HPV nas lesões variam de acordo com a sensibilidade e especificidade dos mesmos. São divididos em três categorias:

- a) Baixa sensibilidade: compreendem a imunohistoquímica e a hibridização *in situ*. São capazes de detectar o vírus quando ele estiver presente em mais de 10 cópias do DNA viral por célula;
- b) Moderada sensibilidade: a hibridização *Southern blot*, o *dot blot* e a hibridização *dot* reversa. Detectam o vírus somente quando houver de 1 a 10 cópias do DNA viral por célula e
- c) Alta sensibilidade: engloba a reação em cadeia da polimerase (PCR). Por esse método é possível detectar o vírus em menos de uma cópia do DNA viral por célula.

Na literatura científica a presença de HPV em mucosa normal, apresenta dados bastante conflitantes em virtude da variabilidade de escolhas de métodos bem como dos grupos de pacientes pesquisados, no entanto a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a técnica de biologia molecular mais utilizada para a detecção do DNA do HPV em boca.

Quanto à prevalência do HPV em mucosa oral, a média encontrada tem sido descrita entre 20 a 30%, sendo os tipos 6, 11, 16 e 18 os mais prevalentes. Sua detecção ocorre em cerca de duas a três vezes mais nas lesões pré-cancerosas da mucosa oral e quase cinco vezes mais nos carcinomas orais ⁽³⁵⁾.

O potencial oncogênico do HPV de alto risco se deve à sua capacidade de inserir fragmentos específicos de DNA (genes E5, E6 e E7) no genoma celular do hospedeiro. Como resultado dessa integração, essas proteínas virais acabam por desregular algumas das principais funções dos fatores de supressão tumoral, tais como a p21, a p53 e a pRb resultando em defeitos nos mecanismos celulares de apoptose, de reparação do DNA e de controle do ciclo celular, tornando-se capaz de se perpetuar dentro da célula ⁽³⁶⁾.

Há ainda que se destacar que a infecção pelo HPV se diferencia das clássicas enfermidades de transmissão sexual. Pelo fato do vírus possuir a

capacidade de se manter latente, as lesões podem aparecer muitos anos depois da aquisição como uma consequência de uma diminuição da defesa imunológica e um sinal de reativação viral.

Outros fatores:

Pacientes com câncer de boca apresentam higiene bucal deficiente, e dieta pobre em proteínas, vitaminas e minerais, e rica em gorduras.

Imunosenescência

O sistema imune tem um papel fundamental no desenvolvimento das neoplasias. Os tumores são formados através mutações no DNA, principalmente devido aos fatores oncogênicos já citados, que impedem o processo de apoptose celular, levando as células a se dividirem sem controle. Num organismo com sistema imunológico totalmente funcionante, as células que participam da imunidade, como células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B, causam a destruição das células que sofreram mutação, impedindo o desenvolvimento de um tumor. Essa identificação pelas células imunes se dá através da identificação de antígenos de superfície presentes nas células tumorais, que são antígenos próprios modificados, e que passam então a ser reconhecidos como estranhos ao organismo. Além da destruição, o sistema imune também é capaz de gerar memória imunológica contra o antígeno de superfície identificado, impedindo que haja recorrência desse tumor ⁽³⁷⁾.

Entretanto, no caso de um indivíduo com imunocompetência diminuída ou um tumor com células pouco imunogênicas as células neoplásicas conseguem contornar a vigilância que o sistema imune realiza. Sendo assim não há eliminação da totalidade dessas células, e o tumor consegue se desenvolver ^(37,38).

Sobrevida

Tanto o envelhecer como o morrer são fenômenos inerentes à vida em todas as suas formas. Dentre as muitas definições de envelhecimento, uma é muito

utilizada na área de saúde. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) o define como *“um processo sequencial, individual, acumulativo, irreversível, universal, não patológico, de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de maneira que o tempo o torne menos capaz de fazer frente ao estresse do meio-ambiente e, portanto, aumente sua possibilidade de morte”*.

Desta forma, o envelhecimento pode ser compreendido como um processo natural, de diminuição progressiva da reserva funcional dos indivíduos, conhecido como senescência e que em condições normais não costuma causar doenças. Já, o envelhecimento patológico (senilidade) predispõe o indivíduo a patologias ao longo de sua vida, acarretando uma menor sobrevida.

Em um estudo brasileiro tendo como fonte de dados a Base Onco realizado com pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) revelou que a taxa de sobrevida específica em cinco anos foi de 60%. Os fatores associados à menor sobrevida específica foram: ter idade > 40 anos, apresentar estágio III ou IV; localização em língua, assoalho de língua e base de língua; não realizar tratamento cirúrgico, realizar somente quimioterapia ou radioterapia e quimioterapia e residir em determinados estados do Brasil ⁽³⁹⁾.

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) nos últimos anos, a taxa global de novos casos de câncer de boca e orofaringe tem se mantido estável para homens e com um pouco de decréscimo para as mulheres. No entanto, o número de casos relacionados à infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) vem aumentando tanto em homens como em mulheres brancas.

O diagnóstico precoce é o meio mais eficaz de que se dispõe para melhorar o prognóstico do câncer e conseqüentemente aumentar a taxa de sobrevida. Vale ressaltar que quando os pacientes com diagnósticos recentes de câncer de boca e orofaringe são minuciosamente examinados, uma pequena porcentagem pode desenvolver outro câncer em uma região próxima, como laringe, esôfago ou pulmão.

Entre aqueles que foram curados do câncer de boca e orofaringe, alguns desenvolverão mais tarde outro câncer em áreas como pulmão, boca, faringe e laringe.

Por este motivo, os pacientes com diagnósticos de câncer de boca e orofaringe devem fazer exames de acompanhamento para o resto de suas vidas. Haverá, também, necessidade de evitar o consumo de tabaco e álcool, pois são fatores de risco de desenvolver um segundo câncer.

CONCLUSÕES

O carcinoma espinocelular oral exibe elevadas taxas de mortalidade, mesmo com o avanço das modalidades terapêuticas, o que se atribui principalmente à resposta variada ao tratamento e à falha no diagnóstico precoce. Grande parte dos casos diagnosticados da doença é detectada em sua fase avançada, em indivíduos de baixa renda, com pouca escolaridade e com limitado acesso aos serviços de saúde. No entanto, esta neoplasia pode ser prevenida através de ações que facilitem a identificação dos principais fatores de risco, que são, em sua maioria, de ordem socioambiental, e pela realização de práticas que busquem o diagnóstico precoce de lesões suspeitas, possibilitando maiores chances de cura e um aumento da sobrevida dos pacientes.

Uma vez que essa patologia predispõe à perda da funcionalidade com conseqüente diminuição de sua qualidade de vida e de sobrevida, investimentos científicos na área do envelhecimento, especialmente com idosos portadores de câncer, são necessários, para que ocorra melhoria das políticas públicas com o intuito de promoção e prevenção de saúde.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. [citado 2015 Set 02]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.

2. Choi KK *et al.* Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol.*, v.42, n.2, p.208-17, 2006.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. [citado 2015 Ago 26]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. [citado 2015 Ago 26]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>
5. Volkweis MR. *et al.* Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Câncer Bucal em um CEO. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac, Camaragibe* v.14, n.2, p. 63-70, abr/jun. 2014.
6. Carvalho SHG *et al.* Levantamento Epidemiológico dos Casos de Câncer de Boca em um Hospital de Referência em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, 12(1):47-51, jan./mar., 2012.
7. Perez RS *et al.* Estudo Epidemiológico do Carcinoma Espinocelular da Boca e Orofaringe. *Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol.*, São Paulo, v.11, n.3, p. 271-277, 2007.
8. Costa AM *et al.* Campanha de prevenção e diagnóstico precoce do câncer bucal: perfil dos idosos participantes. *Rev. bras. odontol.*, Rio de Janeiro, v. 70, n. 2, p. 130-5, jul./dez. 2013.
9. Scheufen RC *et al.* Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca: Screening em Populações de Risco. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, 11(2): 245-249, abr./jun. 2011.
10. Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients over 75 years old. *Aging Clin Exp Res.* 2011 Jun;23(3):231-5.

11. Miyamoto KN, Bruhn RF, Rosa DS, Capelli FA, Kanda JL. Tratamento do carcinoma epidermóide de orofaringe com quimioterapia e radioterapia. Ver Bras Cir Cabeça Pescoço. 2014;43(1):1-5.
12. Malafaia O. Experiência de 15 anos com o tratamento paliativo do câncer de esôfago através da tunelização esofágica. Rev Col Bras Cir. 1986;13(5):211-15.
13. Perussi MR, Denardin OVP, Fava AS, Rapoport A. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. Ver Assoc Med Bras. 2002;48(4):215-37.
14. Kowalski ISG, Souza CP. Social representations of relatives and patients with oral and oropharyngeal squamous carcinoma on the prevention and diagnosis of cancer. Acta Oncol Bras. 2001;21(1):206-10.
15. Wildt J, Bundgaard T, Bentzen SM. Delay in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1995;20(1):21-5.
16. Organização Mundial de Saúde (OMS). Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10. Porto Alegre: Artmed; 1993.
17. Associação Médica Brasileira (AMB). Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Aliança de Controle do Tabagismo. Evidências Científicas sobre tabagismo para subsídio ao Poder Judiciário São Paulo: AMB, 2013, [citado 2015 Ago 26]. Disponível em: <http://www.projetoDiretrizes.org.br/diretrizes12/tabagismojudiciario.pdf>
18. Almeida AA, Bandeira CM, Gonçalves AJ, Araújo, AJ. Dependência nicotínica e perfil tabágico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. J Bras Pneumol. 2014;40(3): 286-93.
19. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (CONPREV). Implantando um programa de controle do tabagismo e outros fatores de risco em unidades de saúde. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2001.

20. Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* 1998; 34: 347-352.
21. Brugere J, Quenel P, Leclerc A, Rodriguez, J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer* 1986; 57: 391-395.
22. Squier CA, Wertz PW. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery. In: Rathbone MJ (ed). *Oral mucosa drug delivery*. New York: Marcel Dekker; 1996:1-26.
23. Squier CA, Finkelstein MW. Mucosa bucal. In: Ten Cate AR. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001:323-39.
24. Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Sant'Ana Filho M. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2008; 54(1): 49-56.
25. Homann N, Tillonen J, Meurman JH. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:663–8.
26. Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, et al. Acetaldehyde production by nonpathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer*. 2000;88(3):342-50.
27. Tilonem J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23(8):1409-415.

28. Ciesielski FIN, Biasoli ER, Goiato MC, Carli JP, Oliveira da Silva S, Linden, MSS, Trentin MS, Miyahara GI. Biofilmes orais como um possível fator de risco. *Odonto*. 2010;18(36):127-38.
29. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983;12:418-24.
30. Syrjänen S. Human papillomavirus in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005;32(Suppl):S59-66.
31. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head and Neck*. 2002;24(9):841-49.
32. Terai M, Takagi M, Matsukura T, Sata T. Oral wart associated with human papillomaviruses type 2. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:137-40.
33. Marone SA, Gusmão RJ. HPV em outras especialidades, epidemiologia, diagnóstico e tratamento. In: Carvalho JM, Oyakawa N. 1ª Consenso Brasileiro do HPV. São Paulo: Editora BG Cultural; 2000.p.87-95.
34. Castro TPPG, Bussoloti Filho I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2006; 72(2): 272-82.
35. Miller CS, Johnstone BM, Ky L. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2001;91(6):622-35.
36. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*. 2007;86(2):104-14.

37. Finn, OJ Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol.* 2012; 23 (8).
38. Barreto, RC *et al.* Relação Papilomavírus (HPV) e Tumor Maligno da Cavidade Bucal. *Rev Bras Cien Saúde.* 2014; 18(3):261-270.
39. Bonfante GMS, Machado CJ, Souza PEA, Andrade EIG, Acurcio FA, Cherchiglia ML. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2014; 30(5):983-97.

4.2. Artigo 2.

Submetido à Revista Head and Neck (**Anexo 8**).

Presence of human papillomavirus DNA in head and neck squamous cells carcinoma biopsies from adults and elderly patients

Stella Vidal de Souza Torres, DDS,^{1*} Alessandra Sbegue,² Fernanda Viviane Mariano, PhD,³ Albina Messias Milani de A. Altemani, PhD,³ Carlos Takahiro Chone, PhD,⁴ Sandra Helena Alves Bonon, PhD,⁵ Sandra Cecília Botelho Costa, PhD^{1,6}

¹Gerontology Postgraduate, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ²Medicine Graduate, Pontifical Catholic University of Campinas/PUCCAMP, Campinas, SP, Brazil. ³Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ⁴Department of Ophthalmology and Othorrinolaryngology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ⁵Laboratory of Virology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ⁶ Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Acknowledgements

We thanks to Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção à Saúde da Mulher (CAISM), State University of Campinas (Unicamp) for kindly providing the HPV 16 positive samples, Gabriel Solyszko for conducting statistics analysis for our study and Rodrigo Gonçalves de Lima, the technical assistance of Virus Lab.

Financial support: this research was supported by CAPES 2011-2014.

***Corresponding author:** S.V.S. Torres, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Cidade Universitária Zeferino Vaz CEP: 13083-887 – Campinas, SP, Brasil E-mail: stellavidal@yahoo.com.br

ABSTRACT: Background. The relationship between human papillomavirus and cancers has been demonstrated in the literature, and this study aims to verify the presence of HPV DNA virus in squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC) in adults and elderly patients.

Methods. Sixty-eight samples of fresh tissue and paraffin-embedded were studied between the years 2010 and 2014 through the analyses of polymerase chain reaction (PCR and nested PCR) considering the histopathological findings and the main risks factors to which these individuals have been exposed.

Results. The prevalence of HPV was 35% in fresh samples, 12.5% in paraffin-embedded samples and 19.1% evaluating all samples together. Histopathological findings showed koilocytosis present in most positive cases for HPV virus.

Conclusion. Viral infections should be considered as an important risk factor in the development of cancer in humans, exceeded only by the consumption of tobacco and alcohol.

KEY WORDS: squamous cell carcinoma, human papillomavirus (HPV), head and neck cancer, elderly, Polymerase Chain Reaction (PCR and nested-PCR).

INTRODUCTION

The incidence of head and neck cancer has been increasing in the elderly in recent years, and the most prevalent is the squamous cell carcinoma (SCC)^{1,2}. Several risk factors have been associated with the development of these neoplasms, including smoking, alcohol use, diet, body mass index (BMI) >25 and poor oral hygiene^{3,4,5,6}. In addition, the human papillomavirus (HPV) are considered in the literature as a factor involved in the genesis of some cancers of head and neck⁷. The prevalence of HPV presence in the SCC lesions varies in the literature between 18% and 82%⁸, but there are not many studies in Brazil on this subject.

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus that presents tropism for epithelial cells, causing infections on the skin and mucous membranes. Replication of HPV occurs in the nuclei of squamous cells and its life cycle is directly related to the differentiation program of the host cell⁹.

The first evidence for the oncogenic potential of HPV virus was obtained in the fifties through the study of epidermodysplasia verruciformis (EV), a rare disease characterized by abnormal susceptibility to human papillomaviruses (HPVs) on the skin¹⁰. In 1974, Hausen *et al.*¹¹ initiated the development of research that linked HPV to cervical cancer and in 1987, Syrjänen and cols.¹² found a possible link between oral cancer and HPV through the observation of cytological abnormalities in oral lesions similar to those found in cervical cancer induced by HPV.

According to the authors Dhariwal, Cubie and Southam the diagnosis of oral HPV infection should be based on a combination of clinical and histopathology features and the most known viral cytopathic effect is koilocytosis, considered to be a major characteristic of HPV infection¹³.

The purpose of this study was to verify the presence of HPV DNA in samples of fresh tissue surgically removed and paraffin-embedded samples of adults and elderly patients diagnosed with squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC) through the molecular analyses using polymerase chain reaction (PCR and nested PCR) considering the histopathological findings and the main risks factors to which these individuals have been exposed.

MATERIALS AND METHODS

Study Design Observational, descriptive and cross-sectional study, with the categorical variables covering socio-demographic, clinical, histopathological and therapeutic data. Adult and elderly patients diagnosed with head and neck cancer were analyzed, assessing the presence of human papillomavirus (HPV) using the nested polymerase chain reaction (PCR and nested-PCR). We included only cases that had blocks in good conditions and with sufficient amount of tumor tissue to perform the punch technique and subsequent enzymatic reactions. As inclusion criteria were selected adult and elderly of both gender, over forty years old, that have been diagnosed with cancer for the first time. Patients having a history of tumors or recurrence; those who had undergone transplants of any kind or presenting impairment in their general condition that could worsen their immune system were excluded from the study. The project was approved by the Ethics Committee of the

FCM/Unicamp under the protocol number: 15380213.0.0000.5404 at Platform Brazil and all patients signed an informed consent term to participate in the study.

Socio-demographic, clinical, histopathological and therapeutic data

Access to demographic data and clinical of treatment were collected from their medical records of the FCM/Unicamp. Data were recorded on a data collection sheet previously made by researchers and then transferred to Excel program for analysis.

Study samples The samples was conducted in the Laboratory of Virology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - FCM/Unicamp. In total sixty-eight samples were obtained from adult and elderly patients with head and neck cancer was studied: forty-eight paraffin-embedded samples were from the Department of Pathology of the Clinical Hospital of University of Campinas (FCM/Unicamp) and twenty fresh samples were from Dental Service and the Department of Otorhinolaryngology of Clinical Hospital of FCM/Unicamp. The study was done between the years 2010 and 2014. All specimens had positive histopathological findings for squamous cell carcinoma (SCC), present in the head and neck region.

Sample preparation Each paraffin-embedded sample was analyzed histologically by a pathologist from Department of Pathology at FCM/Unicamp. The best slides were separated, and the tumor area was marked using a permanent market pen, overlapping this microscope slide on the corresponding block in order to collect the study material using the punch technique. The material was stored in Eppendorf vials of 1.5 ml and sent to the Laboratory of Virology to carry out the DNA extraction.

Extraction and quantification of DNA All the paraffin samples were processed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN Ltd., Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol. The obtained genomic DNA concentrations were estimated using the ND-1000 spectrophotometer NanoDrop® and processed samples were stored at -20°C.

Human β -globin PCR All DNA extracted from samples were subjected to amplification of a gene fragment of human β -globin gene (110 base pairs-bp) using primers PC03 and PC04 (**Table 1**) to confirm the presence of DNA fragment and the absence of PCR inhibitors. Positive control from one β -globin sample, known as positive was used and ultra pure water was used as negative control. When the result of the amplification was negative the PCR was repeated and the DNA re-extracted and subjected to a new PCR. Each amplification reaction was performed in a total volume of 20 μ l and contained: 1 μ l of DNA, 10 μ l of Go Taq® Green MasterMix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 0.2 mM of forward primer (PC03), 0.2 mM of reverse primer (PC04) and 8.6 μ l ultrapure water¹⁴. The reaction was performed in a thermocycler (Biocycler MJ96 + / MJ96G) with the following programming: 3 min at 94 ° C for DNA denaturation, followed by 40 cycles of 94 ° C for 30 seconds, 55 ° C for 1 minute and 72 ° C for 1 minute, and a step of 72 ° C for 2 minutes for the final extension of the DNA. To verify the presence of human DNA, the samples were analyzed by agarose gel electrophoresis 2% stained with 0.5mg / ml ethidium bromide in 1X TBE buffer (Tris, Boric acid, ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) and electrophoretic source for 40 minutes at 100 volts. The PCR products were subjected to transilluminator under ultraviolet light (UV), and documented with the help of the Kodak system (software ZoomBrowser EX).

Nested polymerase chain reaction (n-PCR) HPV-DNA in biopsy specimens were detected by nested-PCR technique using primers described by Bouda *et al.*¹⁵; de Roda Husman *et al.*¹⁶. The size of the nested-PCR amplification products was 150 bases pairs. The same protocol was used to amplify the human β -globin gene sequence to guarantee the quality of the extracted DNA. All experiments had two negative controls (one without DNA and the other with a human DNA preparation known to be negative for HPV-DNA) and one positive control (from an aliquot of HPV strain 16).

Detection of HPV DNA by PCR and nested-PCR

HPV PCR amplification The primers used in this technique were MY09 (5'-CTC CMA RRG GAW ACT GATC-3') and MY11 (5'-GCM CAG GGW CTA TAA YAA TGG-3'), produced by Invitrogen Life Technologies, Brazil, to amplify fragments of 450 pairs of bases L1 late region of the viral genome (**Table 1**). In laminar flow, were added 5 μ l of each sample of genomic DNA. As a positive control for HPV infection, we used a DNA sample for a positive HPV-16 strain uterine cervical carcinoma cells. The negative control consisted of amplification mixture and ultrapure water without the presence of DNA. Each PCR reaction was prepared 12.5 μ l Go Taq® Green MasterMix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1.5 μ M forward primer, 1.5 μ M reverse primer and ultra 4.5 μ l water. After mixing, 5 μ l were added to the DNA of each biological sample, bringing the final volume of 25 μ l. The fragments were amplified in a thermocycler (Biocycler MJ96 + / MJ96G) under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 94 for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 40 seconds, with final extension at 72°C for 4 minutes. The PCR products were subjected to

agarose gel electrophoresis 2% in 1X TBE buffer (Tris, Boric acid, ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) for 40 minutes under constant voltage of 100 volts. The PCR products bands visualization was performed by staining with a solution of 0.5 mg/ml ethidium bromide (Invitrogen Life Technologies, Brazil), and photographic documentation with the aid of Kodak software system.

Nested-PCR for HPV amplification In the first stage of the PCR MY09 and MY11 primers were used, with the mixture of components and conditions of temperature cycles described above. After amplification, 2 µl of the product obtained in this first PCR were separated to be used in the second step of nPCR. In the second stage, we used the primers GP5 + primer (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC YAC-3') and GP6 + (5'-GAA AAA TAA ACT AAA TGT TCA TAT TC-3'), produced by Invitrogen Life Technologies®, Brazil, which generate fragments of 150 base pairs (Bouda *et al.*¹⁵; de Roda Husman *et al.*¹⁶). In the amplification mixture, the controls used and the temperature conditions were similar to those of the first stage, with differences in the amount of ultrapure water (13.9 µl) and annealing temperature (43 °C). The nPCR products were subjected to agarose gel electrophoresis 2% under the same technical conditions for PCR, wherein following disclosure, photographic documentation was performed.

Statistical analysis

The results were analysed using the Fisher's exact test to evaluate the differences between the incidence rates of HPV between adults and the elderly from different samples. Relationships between presence of HPV and socio-demographic, clinical, histopathological and therapeutic variables were analyzed by cross-

tabulation and logistic regression model. Independence between categorical variables were tested with Pearson's Chi-square test. Effects of multiple factors in the presence of HPV were determined using a logistic regression model without interaction between variables, where the odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated to determine the magnitude of association. Statistical significance was established at the 5% level ($p < 0.05$) for all statistical analyses. To perform the analyses the glm routine of statistical package R, version 3.3.1 (2016-06-21) was used.

RESULTS

Fresh and paraffin-embedded samples

Twenty (29.41%) fresh samples were used from patients with head-and-neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and were remained the same PCR technique performed in paraffin-embedded samples. During the selection of the blocks were obtained 48 (70.59%) positive cases for head-and-neck squamous cell carcinomas (HNSCC). According to the information collected from medical records were obtained indicators clinical and sociodemographic of the patients, listed below in

Table 2.

The **Table 3** shows that thirteen cases were positive for the presence of HPV DNA virus, corresponding to 19.12% of the total samples.

In the reactions, HPV DNA virus was found in 7 of 20 fresh samples of the group with head and neck cancer (35%). Among the positive cases for HPV in the study group, the mean age was 53.3 years. All were male, 6 (85.7%) of them were

white and 1 (14.3%) hispanic. All were coming from the State of São Paulo, and 6 (85.7%) of them married and 1 (14.3%) single (**Table 3**). Among them, 5 cases (71.4%) were laryngeal SCC, 1 (14.3%) of tongue and 1 (14.3%) of the retromolar region in the oral cavity. All tumors were moderately differentiated. On the staging, we observed one patient (14.3%) was classified in stage II and 6 patients (85.7%) in stage IV. As for treatment, the patient with stage II (T2N0M0) were made only surgery for tumor resection without adjuvant; 4 patients with stage III (T3N2Mx, T3N2M0, T3N2M0, T4N0Mx) were made surgery associated with radiation and chemotherapy, and 2 patients with stage IV (T4N1Mx, T4N2M0) were made only radio and chemotherapy. All patients reported were being smokers, and 6 of them (85.7%) were drinkers (**Table 4**).

Six out of 48 paraffin-embedded specimens (12.5%) were positive for HPV. Among the positive cases, the average age was 68.5 years, all of them origin from the state of São Paulo. Five patients were male (83.3%) and only one female (16.7%), 4 (66.6%) of them were married, 1 (16.7%) divorced and 1 (16.7%) not specified. Among them, 4 (66.6%) were white, 1 hispanic (16.7%) and 1 (16.7%) black race (**Table 3**).

Of these cases, 3 (50%) were laryngeal SCC, 2 (33.3%) lower lip and 1 (16.7%) of the oral cavity. The differentiation tumors, five (83.3%) were moderately differentiated, and one did not contain information. Regarding the staging, was noted 2 patients (33.3%) classified in stage I, 1 (16.7%) patients in stage II and 3 (50%) patients in stage III. As for cancer treatment, in 5 (83.3%) patients (T1N0M0, T1aN0M0, T2N0M0, T3N0Mx, T3N1Mx) were made only surgery for tumor resection, and 1 (16.7%) patient with stage III (T3N1Mx) was associated surgery and the

radiotherapy. All of them (100%) reported smoking history, and 4 of them (66.6%) also reported alcohol use (**Table 4**).

We observed in the tables 3 and 4 there no level of variable was significant. Exceptions were the variables: age, ethnicity, alcohol use and stage. For the age variable, there is evidence (OR=0.29; 95% CI=0.08-1.04; $p=0.058$) that the proportion of positive HPV among adults is greater than the proportion among the elderly. The stage variable it not seems to be enough information. The cancer stage is not really influential as to the HPV positive condition. The variable use of alcohol was very significant where drinkers has 4.58 times more likely to be HPV positive (OR = 4.58; 95%CI = 0.92 - 22.64).

Histopathological findings showed koilocytosis present in most cases positive for the HPV virus in both for fresh samples as well as in the paraffin-embedded. (**Figure 1 and Figure 2**). The cell has increased reactive nuclei and a characteristic deep halo separated from the cytoplasm by a sharply condensed border.

DISCUSSION

Oral cancer in Brazil is of great concern, with high rates of incidence and mortality. According to estimates of INCA (National Cancer Institute) for the year 2016, there will be about 15,490 new cases of oral cavity cancer in Brazil, being more prevalent in the Southeast, Northeast and South of country¹⁷.

While the prevalence of head and neck cancer in general has declined, the HPV-related oropharyngeal cancer has increased steadily in recent decades^{18,19}. In a meta-analysis study comparing 269 studies and 19,638 patients, it has seen an increase in the prevalence of HPV related SCC, which went from 40.5% before the

year 2000, 64.3% between 2000 and 2004 to 72.2% between 2005 and 2009²⁰. This increase can be explained by changes in people's sexual behavior, which is more exposed to infection by this virus¹⁹. According to recent research 95% of oral cancers are squamous cell carcinomas¹, and 75% of diagnosed cancers have HPV in the lesion¹⁸.

According to research carried out, the SCC related to HPV has distinct pathophysiology of cancers linked to other risk factors, which have impact on the treatment and prognosis of the neoplasia¹⁸.

The prevalence of HPV in the SCC lesions varies in the literature between 18% and 82%⁸. This wide variation may be explained by the heterogeneity of studies with different sample types, methods and primers. Through literature review was concluded that the use of the fresh samples and conducting PCR with GP5 + / GP6 + and MY09 / MY11 increase efficiency of reactions, most of the virus detection probability. In this study, the prevalence of HPV in paraffin-embedded samples was 12.5%, while in the fresh samples was 35% in head and neck SCC. The literature also shows minor HPV detection rates in paraffin samples compared to the fresh samples, mainly due to degradation of the genetic material in samples²¹.

In meta-analysis study of 4680 samples of 94 studies was found a prevalence of HPV in oral SCC 46.5%, while in normal mucosa was 10%²². The prevalence of HPV in the general United States population is estimated at 7%²³. Esquenazi *et al.*²⁴ evaluated 100 individuals between 21 and 31 years without clinical lesions and not obtained positive cases for HPV. Already Araújo *et al.*²⁵ and Tristão *et al.*²⁶ found similar prevalence in normal mucosa (24.1% and 23.2%, respectively). The research in normal mucosa virus is important for patient follow-up and early detection of

possible injuries. However, not all who get HPV will develop cancer, indicating that there is an individual variation in susceptibility to this disease²⁷.

Several risk factors had been established for this type of cancer, the main ones being the smoking, alcohol abuse and viral infections, such as HPV^{4,5}. In our study, 80.9% of subjects were smokers, and those who were positive for HPV had this risk factor present. In relation to alcohol use, 60.3% of patients reported this habit, which was present in 76.9% of HPV-positive SCC.

In a study conducted in Brazil in 2007 with 40 samples of fresh SCC in patients with a mean age of 45.2 years, found a prevalence of 22.5%²⁸. In it 85% of patients were smokers, and it had already been shown in the literature that smoking may act synergistically with HPV in carcinogenesis oral process²¹. No one knows for sure how this interaction occurs, but one theory is that the epithelial damage caused by tobacco facilitates virus entry, or also by immunosuppression caused by smoking, which allows a higher rate of infection HPV²⁹. In our study, analyzing all the fresh and paraffin samples, the prevalence of HPV in HNSCC was 19.1%. The average age of the population was 60.9 years. All patients with positive-HPV SCC were smokers, which corroborates the hypothesis that there is a synergism between smoking and HPV infection. Already D'Souza *et al.*³⁰ found that the correlation between HPV and oropharyngeal cancer was higher in individuals without history of smoking or alcohol consumption.

An India study was conducted with 23 paraffin-embedded samples, and 3 of them were positive, 2 women and one man³¹. According to data from INCA, in Brazil, the incidence of oral SCC and larynx is more common in males, with estimates for the state of São Paulo from 4700 cases in men and 1320 cases in women in the year 2016¹. In the literature, the highest prevalence of HPV in oral carcinoma occurs in

males. In this study 92.3% of positive-HPV SCC patients were male. A study this year found that men have higher risk of having a persistent infection HPV³², which increases the risk of cancer associated with these virus.

In the study conducted by López⁸, the prevalence of HPV in the tumor tissue was 12.5%, but the positivity rate is higher in women (13.3% of cases) than in men (7.7%), and in younger individuals, mostly under 40 years (22.2%).

In a systematic review that evaluated 5046 samples of 60 studies from 26 countries, with assessment of HPV by PCR, HPV genotype 16 was the most frequent, followed by HPV 18, which agrees with most of the findings in the literature and found a prevalence of 26% of SCC HPVpositive. The prevalence was higher in oropharyngeal lesions in the oral cavity and larynx³³.

The positive HPV oral cancer is more common, generally the base of the tongue and tonsil, and affects younger men, whites, with certain sexual habits as more partners and first sexual activity with more youngers age²³. In the present study the places more positive for HPV were larynx (61%), followed by lower lip (15.4%) and oral cavity (15.4%) and tongue (7.7%). Most positive HPV SCC patients were white (76.9%), similar to that found in the literature. The sexual habits of the patients were not evaluated for lack of this information in the medical records.

Soares *et al.*³⁴ studied 75 patients with mean age of 65.45 years and found a prevalence of 24% of the HPV virus in the SCC samples. In Colombia, among 175 cases of SCC of the head and neck, were found the presence of HPV in 18.9% of cases. The mean age of patients was 64 years. However, HPV was found more often in younger individuals³⁵. In a study done in São Paulo with 30 SCC samples of oral floor, with patients over 60 years, which were made DNA extraction from paraffin-

embedded samples and PCR reaction, no sample was positive for the HPV³⁶. In our study, which was also done with an older population (average 64.4 years), the prevalence of HPV in tumor lesions was 19.1%. In literature HPV-related SCC occurs mainly in younger subjects (<40 years), which can be explained by the fact that more young people have more sexual partners, which is an important risk factor for acquiring the infection by HPV^{27,37}. However, there are few studies assessing the prevalence in most aging populations.

This type of cancer can be detected simply by viewing the oral cavity in search of lesions, a low-cost method that can be done by the individual himself. Nevertheless most of these cancers are diagnosed in advanced stages (stages III and IV), which decreases the survival patients³⁸. In this study, 14.7% of cases were diagnosed in stage I, 25% in stage II, 19.1% in stage III and 39.7% in stage IV, with the majority (50%) of the SCC HPV-positive were in stage III. This suggests early diagnosis of these lesions is not being done, it will impact even the prognosis of these patients.

In Brazil, the survival rate at five years for the oral and oropharyngeal cancer is less than 50%^{8,39}. However, it has been found that the survival of patients with HPV-related oral cancer is higher when compared to cancer by other etiological factors, as tagabism⁴⁰. Fakhry *et al.*⁴¹ found that patients with positive-HPV tumors had higher response after chemotherapy and radiation and a higher rate of survival after treatment when compared with HVP negative tumors. The patients evaluated in this study, only 41.2% underwent surgery to remove the lesion, and were those who were diagnosed at early stages, with minor injuries, and therefore these individuals have a greater chance of cure and survival. Half of them underwent surgery associated with radiotherapy and additional chemotherapy, and in those patients the

illness is in a more advanced stage. In 7.3% of cases was performed only adjunctive treatment in patients with very advanced stage.

The later the tumor is diagnosed the more the patient's suffering is in relation to treatment and the prognosis is worse with increased recurrence risk of injury. In a study done with public patients some factors were associated with shorter survival of patients: over 40 years, advanced stages (III and IV), tongue injury and surgery treatment not performed⁴².

Zur Hausen¹¹ notes that the HPV infection alone is not able to induce carcinogenesis, however the HPV oncogenic potential might be considered in association with some conditions, such as exposure to physical agents (sun light), chemical agents (tobacco, alcohol) and other viruses (hepatites B virus, herpes virus, cytomegalovirus). The author points out that viruses may contribute to the development of human tumors by different mechanisms: indirectly by inducing immunosuppression or by modifying the host cell genome without persistence of viral DNA; directly by inducing oncoproteins or by altering the expression of host cell proteins at the site of viral DNA integration.

Based on cytology and histopathology, Chaudhary *et al*⁴³. reveals that HPV infection is characterized by koilocytosis, perinuclear cytoplasmic haloes, nuclear dysplasia, atypical immature metaplasia and binucleation. These haloes should be distinguished from the thin perinuclear halos with a view blurred edge in many infections as a nonspecific infection.

These histopathological findings were found in our study in the most of HPV positive samples and indicates that the viral DNA is present within the host cell, however it is not possible to say that it is the causal agent of the HNSCC.

On the other hand, we uncovered evidence of synergy between exposure to HPV and alcohol use in addition to HPV-induced genomic instability. It is known that alcohol acts as a solvent, increasing the penetration of carcinogenic compounds in the oral mucosa and suppressing DNA repair after exposure to nitrosamines.^{44,45} In this way, it could act as an important cocarcinogen and/or tumour promoter, since all individuals with positive-HPV HNSCC had this habit in our study.

The result of this study was compatible with most existing in literature. The prevalence of HPV was 35% in fresh samples, 12.5% in paraffin-embedded samples and 19.1% evaluating all samples together, which is considered an important number, especially at an older age population.

It is important to note that the HPV-positive HNSCC represents a distinct group of tumors with favorable biological and clinical behavior which leads to a better treatment response and survival outcomes. The head and neck cancer is becoming more prevalent in the population and the definition of its etiology is very important for prevention and early detection in high-risk individuals. However, more studies are needed with the elderly population to assess how the elderly's immune system reacts to these viral infections.

Therefore, this is important to assess the prevalence of this type of cancer, and also its epidemiological characteristics, so there is an early diagnosis of this disease with effective treatment, thus improving the patient's prognosis.

REFERENCES

1. Castro TPPG, Bussoloti Filho, I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(2):272-282.
2. Demathe A, Garcia JF, Mattar NJ, Simonato LE, Miyahara GI. Human papillomavirus (HPV) detection in lip squamous cell carcinoma: correlation with clinical aspects and risk factors. *Rev Bras Epidemiol* 2011;14(1):98-105.
3. Decker J, Goldstein JC. Risk Factors in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 1982; 306:1151-1155.
4. Volkweis MR, Blois MC, Zanin R, Zamboni R. Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Câncer Bucal em um CEO. *Rev Cir Traumatol. Buco-Maxilo-Fac* 2014;14(2):63-70.
5. Carvalho SHG, Soares MSM, Figueiredo RLQ. Levantamento Epidemiológico dos Casos de Câncer de Boca em um Hospital de Referência em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2012;12(1):47-51.
6. Gondivkar SM *et al.* Involvement of viral factors with head and neck cancers. *Oral Oncology* 2012;48(3):195-199.
7. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the Clinical and Biologic Aspects of Human Papillomavirus-Positive Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *International Journal of Radiation Oncology*. 2014; 88(4):761-770.
8. López RVM. Papilomavírus humano e prognóstico de tumores de cabeça e pescoço [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

9. Leto MGP, Santos Junior GF, Porro AM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):306-17.
10. Lazarczyk M, Pons C, Mendoza JA, Cassonet P, Jacob Y, Favre M. Regulation of cellular zinc balance as a potencial mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *The Journal of Experimental Medicine* 2008;205(1):35-42.
11. Zur Hausen H. Viruses in human câncer. *Science* 1991;254(5035):1167-1173.
12. Syrjänen S M. Human papillomavirus infection in the oral cavity. In: Syrjänen K J, Gissmann L, Koss LG, editor. *Papillomaviruses and human disease.* Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. p. 104 -137.
13. Xavier SD, Bussoloti Filho I, Lancelloti CLP. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. *Rev Bras de Otorrinolaringol* 2005;71(4):510-514.
14. Saiki RK *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell ANEMIA. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.
15. Bouda M. *et al.* High risk HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000;13(6):644-653.
16. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human

- papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology* 1995;76:1057-1062.
17. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>. [Acesso em 23/04/16].
18. Moore II K.A, Mehta V. The Growing Epidemic of HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical review for Primary Care Providers. *J Am Board Fam Med* 2015;28(4):498-503.
19. Farsi NJ *et al.* Sexual behaviors and head and neck cancer: A systematic Review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology* 2015;39(6):1036-1046.
20. Gooi Z, Chan JYK, Fakhrt C. The Epidemiology of the Human Papillomavirus Related to Oropharyngeal Head and Neck Cancer. *Laryngoscope* 2016;126:894-900.
21. Souza TRB, Gonçalves AJ. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma espinocelular da cavidade oral. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2009;38(1):62-66.
22. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-635.
23. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24:379-396.
24. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho MGC, Barros FS. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010;76(1):78-84.

25. Araújo MVA, Pinheiro HHC, Pinheiro JJV, Quaresma JAS, Fuzzi HT, Medeiros RC. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) em Belém, Pará, Brasil, na cavidade oral de indivíduos sem lesões clinicamente diagnosticáveis. *Cad Saúde Pública* 2014;30(5):1115-1119.
26. Tristão W, Ribeiro RMP, Oliveira CA, Betiol JC, Bettini JSR. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* 2012;78(4):66-70.
27. Sun Y, Zhang Y, Liu L, Song X, Li G. Genetic polymorphisms and HPV infection in oral squamous cell carcinomas. *Current Opinion in Virology* 2015;14:1-6.
28. Vidal AKL, Caldas Júnior AF, Mello RJV, Brandão VRA, Rocha GI, Taromaru E. HPV detection in oral carcinomas. *J Bras Patol Med Lab* 2004;40(1):21-6.
29. 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;132:105-107.
30. D'Souza G. *et al.* Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2007;356(19):1944-1956.
31. Dhanapal R, Ranganathan K, Kondaiah P, Devi RU, Joshua E, Saraswathi TR. High-risk human papillomavirus in archival tissues of oral pathosis and normal oral mucosa. *Contemp Clin Dent* 2015;6:148-152.
32. D'Souza, G. *et al.* Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis* 2016;213(12):1893-1896.

33. 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):467-475.
34. Soares, R.C. *et al.* Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery* 2007;28:397-400.
35. Quintero K *et al.* Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79(3):375-381.
36. Simonato LE, Tomo S, Garcia JF, Veronese LA, Miyahara GI. HPV detection in floor of mouth squamous cell carcinoma by PCR amplification. *J Bras Patol Med Lab* 2016;52(1):43-49.
37. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1-8.
38. Perez RS, Freitas SM, Dedivitis RA, Rapoport A, Denardin OVP, Sobrinho JA. Estudo Epidemiológico do Carcinoma Espinocelular da Boca e Orofaringe. *Arq Int Otorrinolaringol / Intl Arch Otorhinolaryngol* 2007;11(3):271-277.
39. López RVM *et al.* Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*. 2014;25:461-471.
40. Mehanna H *et al.* Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer - systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head and Neck* 2013;747-755.

41. Fakhry C *et al.* Improved Survival of Patients with Human Papillomavirus – Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261-269.
42. Torres SVS, Sbegue A, Costa SCB. A importância do diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos. *Rev Soc Bras Clin Med.* 2016;14(1):57-62.
43. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head & Neck Oncology* 2009;1(22): 1-12.
44. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004;39(3):155-165.

Conflict of interest statement

All authors declare that there were no financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) this work.

TABLE 1. List, sequences and product size of primer pair used in PCRs.

Primer	Sequence (5' - 3')	Product size
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	110 pb
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	
MY09	CTC CMA RRG GAW ACT GATC*	450pb
MY11	GCM CAG GGW CTA TAA YAA TGG*	
GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACY AC	150pb
GP6+	GAA AAA TAA ACT TGT AAA TCA TAT TC	

* The code of nitrogenous bases for MY09 and MY11 primers is: M = A or C, R = A or G, W = A or T and Y = C or T.

TABLE 2. Characteristics socio-demographic, clinical, histopathological and therapeutic data in 68 patients with HNSCC – fresh and paraffin-embedded samples.

Variables	Categorical	Samples		No. of patients (n=68)	
		Fresh (n=20)	Paraffin (n=48)	N	%
Gender	Male	19	37	56	82.35
	Female	1	11	12	17.65
Race	White	17	44	61	89.70
	Brown	3	3	6	8.83
	Black	0	1	1	1.47
Age	40 to 49 years	4	0	4	5.88
	50 to 59 years	8	4	12	17.65
	60 to 69 years	8	27	35	51.47
	70 to 79 years	0	12	12	17.65
	80 to 90 years	0	5	5	7.35
Place of origin	São Paulo	20	46	66	97.06
	Minas Gerais	0	2	2	2.94
Marital status	Married	17	27	44	64.70
	Widowed	0	10	10	14.71
	Divorced	1	8	9	13.24
	Single	2	2	4	5.88
	Others	0	1	1	1.47
Tabacco use	Yes	19	36	55	80.88

	No	1	12	13	19.12
Alcohol use	Yes	17	24	41	60.30
	No	3	24	27	39.70
Tumour location	Larynx	9	13	22	32.35
	Inferior lip	0	11	11	16.18
	Oral cavity	6	11	17	25.00
	Tongue	5	5	10	14.71
	Other locations	0	8	8	11.76
Degree of differentiation	Poorly differentiated	3	2	5	7.35
	Moderately differentiated	15	33	48	70.59
	Well-differentiated	1	7	8	11.76
	Undifferentiated	1	0	1	1.47
	No information	0	6	6	8.83
TNM Stage	Stage I	2	8	10	14.71
	Stage II	3	14	17	25.00
	Stage III	1	12	13	19.12
	Stage IV	14	13	27	39.70
	No information	0	1	1	1.47
Treatment	Surgery	2	26	28	41.18
	Surgery+Adjuvance Therapy	12	22	34	50.00
	Only adjuvance	5	0	5	7.35
	None	1	0	1	1.47

TABLE 3. Socio economic characteristics of patients with HNSCC grouped by the presence of positive HPV.

Variables		HPV+ (n=13)		HPV- (n=55)		Total (n=68)		OR (95%CI)	p-value
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)		
Gender	Male	12	92.31	48	87.27	60	88.24	1	Ref.
	Female	1	7.69	7	12.73	8	11.76	0.57 (0.06-5.40)	0.616
Race	White	10	76.92	51	92.73	61	89.71	1	Ref.
	Hispanic	2	15.38	4	7.27	6	8.82	2.55 (0.40-15.86)	0.315
	Black	1	7.69	0	0.00	1	1.47	-	-
Age	Adults (<60y)	6	46.15	11	20.00	17	25.00	1	Ref.
	Elderly (≥60y)	7	53.85	44	80.00	51	75.00	0.29 (0.08-1.04)*	0.058
Marital status	Single	1	7.69	3	5.45	4	5.88	1	Ref.
	Married	9	69.23	35	63.64	44	64.71	0.77 (0.07-8.32)	0.341
	Divorced	2	15.38	7	12.73	9	13.24	0.85 (0.05-13.47)	0.831
	Widowed	0	0.00	10	18.18	10	14.71	-	-
	Others	1	7.69	0	0.00	1	1.47	-	-
Place of origin	SP	13	100.0 0	53	96.36	66	97.06	1	Ref.
	MG	0	0.00	2	3.64	2	2.94	-	-

Abbreviations: y, years old; OD, odds ratio; *95 CI, confidence interval

TABLE 4. Clinical, histopathological and therapeutic data of adults and elderly with head and neck cancer grouped by presence of HPV positive.

Variables	HPV + (n=13)		HPV – (n=55)		Total (n=68)		OR (95%CI)	p-value	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)			
Tabacco use									
No	1	7.69	12	21.82	13	19.12	1	Ref.	
Yes	12	92.31	43	78.18	55	80.88	3.35	0.268	
							(0.39-28.42)		
Alcohol use									
No	2	15.38	25	45.45	27	39.71	1	Ref.	
Yes	11	84.62	30	54.55	41	60.29	4.58	0.061	
							(0.92-22.64)		
Tumor location									
Oral cavity	4	30.77	18	32.73	22	32.35	1	Ref.	
Pharynx	1	7.69	23	41.82	24	35.29	0.19	0.160	
							(0.02-1.90)		
Larynx	8	61.54	14	25.45	22	32.35	2.57	0.182	
							(0.64-10.13)		
Degree of differentiation									
Well-differentiated	0	0.00	8	14.55	8	11.76	1	Ref.	
Moderately differentiated	12	92.31	36	65.45	48	70.59	-	-	
Poorly differentiated	0	0.00	6	10.91	6	8.82	-	-	
Undifferentiated	0	0.00	1	1.82	1	1.47	-	-	
No information	1	7.69	4	7.27	5	7.35	-	-	
TNM Stage									
Stage I	2	15.38	8	14.55	10	14.71	1	Ref.	
Stage II	2	15.38	15	27.27	17	25.00	0.53	0.564	
							(0.06-4.53)		
Stage III	3	23.08	10	18.18	13	19.12	1.2	0.859	
							(0.15-9.01)		
Stage IV	6	46.15	22	40.00	28	41.18	1.09	0.924	
							(0.18-6.55)		
Treatment									
Surgery	6	46.15	23	41.82	29	42.65	1	Ref.	
Surgery+Adjuvance Therapy	7	53.85	31	56.36	38	55.88	0.86	0.816	
							(0.24-0.86)		
Only adjuvance	0	00.00	1	1.82	8	11.76	-	-	

Abbreviations: OR, odds ratio; *95 CI, confidence interval

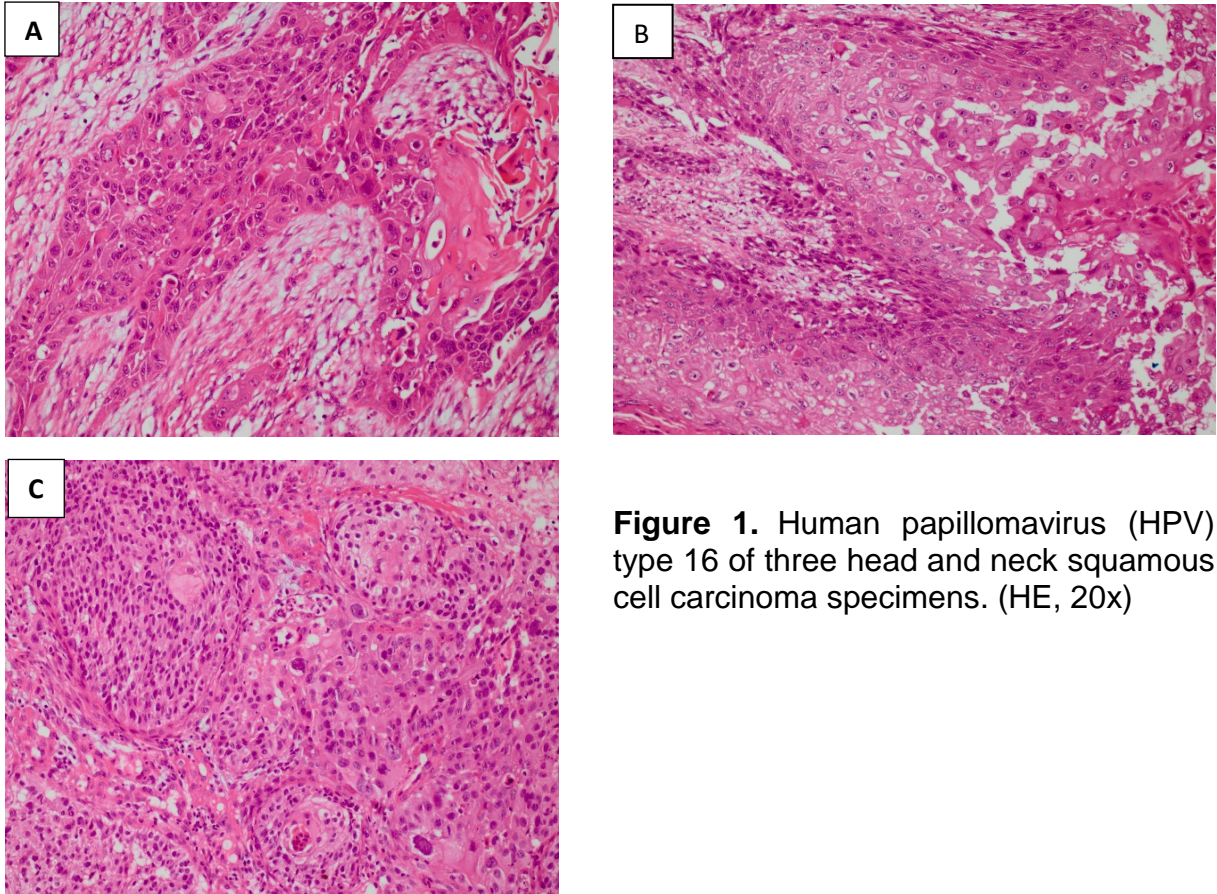


Figure 1. Human papillomavirus (HPV) type 16 of three head and neck squamous cell carcinoma specimens. (HE, 20x)

Fonte¹: Altemani, AMAM

¹ The images were taken and assigned with the permission of Dr. Albina Messias de Almeida Milani Altemani, Coordinator of the Clinical Pathology Department of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas (FCM/Unicamp).

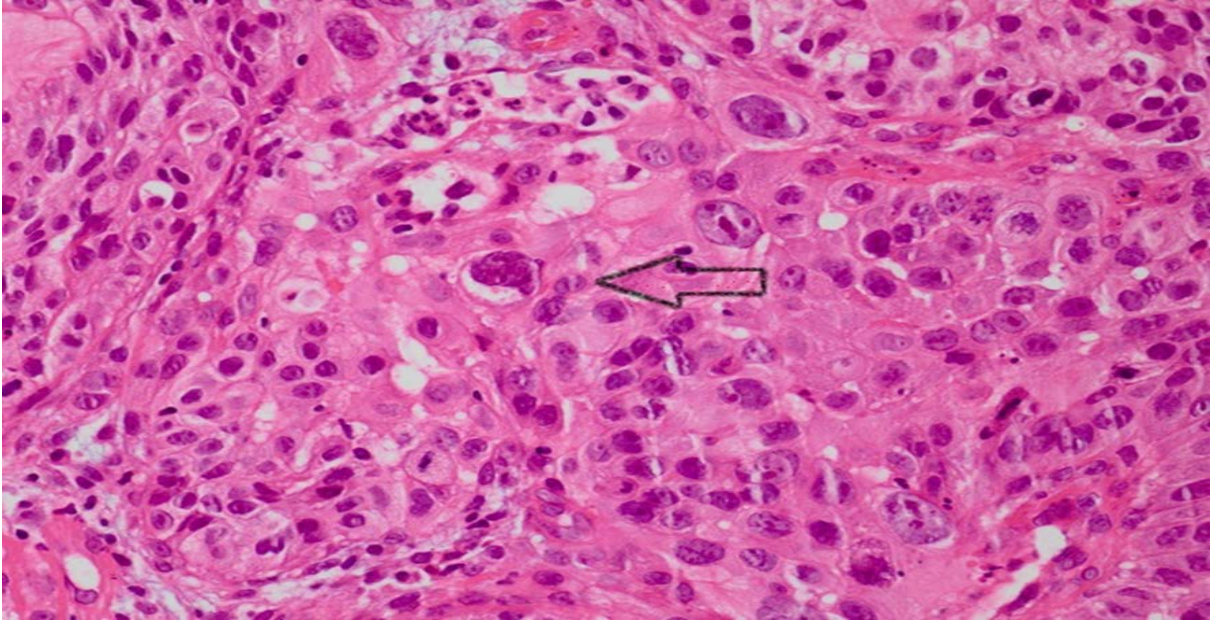


Figure 2. This field shows typical koilocytosis with reactive nuclei, increased and separate deep characteristic halo of cytoplasm by a neatly condensed edge (Fig 1C, HE, x40).

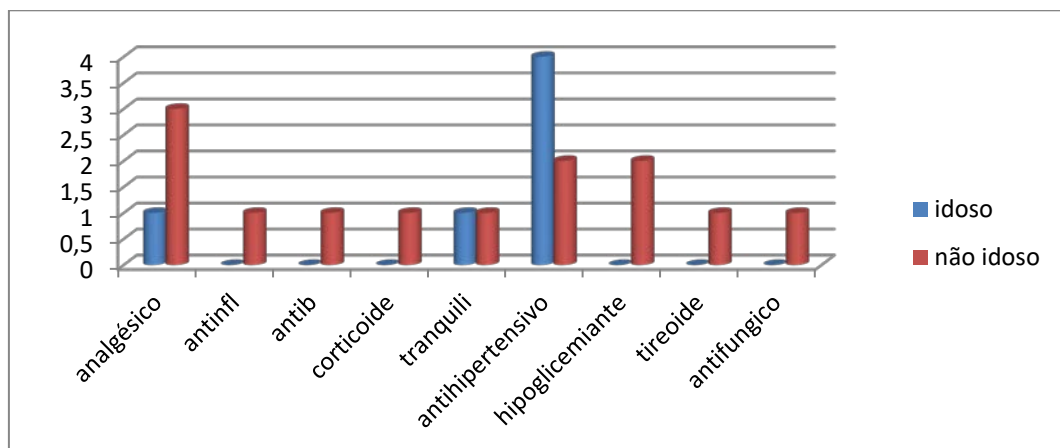
RESULTADOS ADICIONAIS

Informações a respeito da profissão exercida ao longo da vida, uso de medicamentos e doenças relatadas daqueles pacientes que tiveram a presença de DNA do vírus HPV nas amostras do estudo foram contempladas nesta secção. A variável escolaridade não foi incluída, pois grande parte dos prontuários examinados não continham o registro da informação.

Dos treze pacientes que possuíam o DNA do vírus HPV, quatro eram lavradores (30,77%), dois eram pintores (15,39%), 2 eram aposentados (15,39%) e os demais eram funileiro, mecânico, soldador, pedreiro e motorista (7,69%).

O gráfico 1 mostra que os grupos farmacológicos mais utilizados entre os pacientes idosos HPV positivos foram: anti-hipertensivo, analgésico e tranquilizantes, enquanto que entre aqueles com idade inferior a 60 anos faziam uso dos mesmos fármacos que os idosos e também de um grupo maior de medicações.

Gráfico 1 – Grupos farmacológicos utilizados por pacientes adultos e idosos com a presença do DNA do vírus HPV, (n=13). Campinas, SP.



Quanto às doenças relatadas, a de maior prevalência foi a hipertensão arterial, seguida de diabetes mellitus e catarata.

5.DISSCUSSÃO GERAL

Com uma incidência anual de aproximadamente 400 mil novos casos, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP) é hoje a sexta neoplasia mais comum em todo o mundo. Seus fatores de risco principais permanecem sendo o uso de tabaco e álcool. No entanto, descobriu-se que o papilomavírus humano (HPV) está etiologicamente associado a cerca de 20 a 25% dos CECCP, principalmente naqueles tumores localizados em orofaringe^{16,21,38,39}.

A estimativa para o biênio 2016/2017 para a incidência de câncer no Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), aponta 11.140 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e de 4.350 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 11,24 e 4,21 casos novos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer da cavidade oral corresponde a 5,2% de todas as neoplasias e em homens é o quarto mais frequente na região Sudeste (14,58/100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (9,15/100 mil) e Nordeste (6,86/100 mil), ocupa a quinta posição, enquanto, na região Sul (15,91/100 mil) equivale a sexta posição e na Norte (3,46/100 mil), corresponde ao sétimo mais frequente. Para as mulheres, ele é o nono mais frequente na região Nordeste (4,11/100 mil). Nas regiões Sudeste (5,29/100 mil) ocupa a décima posição, enquanto nas regiões Norte (1,76/100mil) e Centro-Oeste (2,79/100 mil) é 12º mais frequente e na região Sul (3,32/100 mil), é o 15º mais incidente²³. O tipo mais comum é o carcinoma de células escamosas, podendo se desenvolver a partir de uma hiperplasia epitelial, passando a ser um carcinoma *in situ* e em seguida para a forma invasora. No entanto, nem todos passam por esses estágios. Quanto à mortalidade, em 2012, foram estimados 145 mil óbitos por câncer no mundo, com um percentual de 80% de ocorrência em regiões menos favorecidas²³.

Para o câncer de laringe, em nosso país, é estimado 6.360 novos casos em homens e 990 em mulheres, com um risco estimado de 6,43 e 0,94 casos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente. Não considerando os tumores da pele não melanoma, em homens, o câncer da laringe é o sexto mais incidente na região Nordeste (5,18/100 mil). Na região Sul (10,85/100 mil) ocupa a sétima posição,

enquanto nas regiões Sudeste (6,59/100 mil), Centro-Oeste (5,52/100 mil) e Norte (3,04/100 mil), a oitava posição. Entre as mulheres é o 16^a mais incidente nas regiões Sul (1,45/100 mil), Centro-Oeste (1,17/100 mil), Nordeste (1,08/100 mil) e Norte (0,62/100 mil), enquanto a região Sudeste (0,70/100 mil), ocupa a 17^a posição²³.

No mundo, o câncer da laringe é o mais frequente e o segundo do aparelho respiratório, sendo o mais comum entre os diversos tipos de câncer da cabeça e do pescoço, representando 25% dos tumores malignos desta região sendo responsável por 2% do total das neoplasias malignas. A mais recente estimativa mundial apontou a ocorrência de cerca de 176 mil casos novos por ano, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 83 mil pessoas por ano. A incidência é maior em homens com idade acima dos 40 anos, sendo raro em mulheres, tendo a razão de sexos (M:F) de 7:1 casos, sendo a maior entre as neoplasias malignas²³.

Observa-se uma tendência de declínio da mortalidade pelo câncer da laringe em vários países, sendo maior em países europeus. O tabaco é o principal fator de risco, que é potencializado ao ser associado ao álcool. Outros fatores são: histórico familiar, má alimentação, situação socioeconômica desfavorável, inflamação crônica da laringe causada pelo refluxo gastroesofágico, HPV e exposição a produtos químicos como amianto, pó de madeira, fuligem ou poeira de carvão e vapores da tinta. Os sintomas mais comuns são a rouquidão duradoura e a infecção persistente. A dificuldade de engolir o alimento (disfagia) com alguma dor ou sensação de queimação pode ser outro sintoma do câncer de laringe, assim como a dispneia ou falta de ar, o mau hálito (halitose), a perda de peso ou, mais raramente, a dor no ouvido. Quando diagnosticado em estágios iniciais, o câncer da laringe possui um bom prognóstico, com alto índice de cura (80% a 100%), independentemente do tipo de tratamento escolhido (cirurgia, radioterapia ou ambas)²³.

Para esse estudo foi esperado obter uma relação entre o vírus HPV e o desenvolvimento do CEC em cavidade oral, a fim de obter a informação de que esse vírus possuía realmente influência na formação dessa neoplasia. Isso foi realizado através da avaliação da presença do vírus na amostra tumoral, o tipo de HPV encontrado e também por meio da correlação com os hábitos do paciente e dos outros fatores de risco a que ele esteve exposto.

Martins Filho⁴⁰ em sua pesquisa, aponta que a grande variabilidade encontrada nos resultados das pesquisas científicas quanto à presença ou não de HPV em células escamosas pode ser em decorrência de fatores que influenciam na sensibilidade do teste diagnóstico, tais como: a integridade do genoma, o tamanho do fragmento de DNA viral, o tipo de amostra disponível e a quantidade de cópias de DNA do vírus e sugere que métodos consagrados como a *nested* PCR e a hibridização *in situ* com sinal amplificado possam ser utilizadas em conjunto para melhorar a sensibilidade da PCR e localizar as células infectadas no tecido de estudo.

Os resultados de nosso estudo foram compatíveis com a maioria dos existentes na literatura. A prevalência do HPV foi de 12,5% entre as amostras parafinadas e de 35% das amostras à fresco, equivalendo à 19,1% das amostras totais estudadas, considerado um percentual importante, principalmente em uma população com idade mais avançada. No entanto, não existem evidências entre HPV positivo e negativo entre idosos e não idosos e o potencial carcinogênico do vírus estudado.

Este menor percentual de DNA viral encontrado em biópsias parafinadas era esperado, pois os tecidos fixados em formol a 10% e embebidos em parafina, apesar de ser um método amplamente utilizado em anatomia patológica, constitui-se de uma metodologia difícil de ser realizada quando da extração de DNA do material a ser estudado em decorrência do envelhecimento de proteínas nucleares, da formação de ligações entre proteínas e DNA, bem como da desfragmentação do DNA⁴¹, diferente da quantidade, pureza e integridade do ácido nucléico encontrado nas extrações realizadas nas biópsias à fresco.

Também observamos em nosso estudo que não foi possível inferir que houvesse uma relação de causalidade entre o vírus HPV e o câncer de cabeça e pescoço mesmo utilizando-se de técnicas moleculares como a *nested*-PCR e de cepas de HPV-16 reconhecidamente como positiva, de modo que é preciso ampliar o modelo de estudo a fim de contemplar fatores ainda não explorados para que a associação seja confirmada.

Por ser o vírus HPV um marcador biológico importante no diagnóstico de tumores moleculares o interesse em estudá-lo se dá por dois motivos: primeiro por diferenciar um carcinoma de células escamosas secundárias de uma metástase e segundo pelo fato dos carcinomas HPV-positivos possuírem não só uma etiologia distinta, mas também um fenótipo morfológico bastante peculiar. Geralmente, eles são caracterizados por diferenças biológicas do tumor como, por exemplo o aumento da sensibilidade à radioterapia⁴².

Tanto a quimioterapia quanto a radioterapia possuem um índice terapêutico limitado com grande chance de efeitos secundários relacionados ao tratamento. Este fato proporcionou a pesquisa de novas terapias que podem destruir células tumorais preservando as células normais.

Assim como D`Abramo⁴³, devemos considerar que apesar da infecção por HPV ser comum e de que grande parte dela seja depletada pelo sistema imunológico, há casos em que a persistência viral torna-se um fator de risco para a progressão da malignidade. Com isso, o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV representou um grande avanço para a prevenção deste tipo de câncer. As vacinas quadrivalente (Gardasil®, Merck *and* Co. Inc.) e bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithKline) parecem ser eficazes no bloqueio de infecções contra os tipos de HPV mais prevalentes. A primeira foi construída baseada em partículas semelhantes à vírus recombinantes (VLP) para imunizar contra os vírus HPV de baixo e alto risco como o HPV6, -11, -16 e -18, enquanto que a segunda tem eficácia contra os vírus de alto risco HPV16 e -18. Com isso, espera-se reduzir a persistência da infecção por HPV, no entanto, ainda não sabemos como se comportarão frente ao câncer orofaríngeo⁴³.

Deste modo, com o nosso estudo, sugerimos que a análise molecular de todas as amostras de biópsias de câncer de cabeça e pescoço realizadas por serviços de oncologia, cirurgia de cabeça e pescoço, otorrinolaringologia e odontologia devam ser realizadas em pacientes de risco com a finalidade de criar um banco de dados para estudos retrospectivos futuros de diagnóstico e terapia deste tipo de tumor que possam permitir uma análise crítica das terapias instituídas considerando suas diferenças geno e fenotípica.

Por terem sua incidência aumentada e por apresentarem uma fisiologia diferente dos demais, o CECCP-HPV positivos exigiu o desenvolvimento de novos métodos de tratamento. Especificamente, os adenovírus condicionalmente replicativos (CRAd) são atraentes como agentes terapêuticos, pois eles têm o potencial de se replicar seletivamente dentro das células alvo de interesse. Devido às semelhanças na forma como o HPV e o adenovírus interagem com reguladores do ciclo celular, a exclusão na região E1a do genoma do adenovírus pode ser usado para atingir as oncoproteínas E6 e E7 dos tumores positivos para HPV⁴⁴. A oncoterapia viral é uma modalidade complementar de tratamento do câncer através do uso de vírus oncolíticos (OVs), que são vírus geneticamente modificados com a finalidade de infectar e destruir células cancerosas. Na construção destes vírus eliminam-se os genes que os tornam patogênicos e alteram-se as proteínas de superfície para que reconheçam, exclusivamente, os receptores de membrana da célula cancerosa. Um exemplo de aplicação desta terapia e que foi aprovada pela FDA em 2015 é o T-Vec (Talimogene laherparepvec, de Amgen). Trata-se do uso do vírus herpes simplex 1 modificado que expressa o gene produtor de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) para o tratamento do melanoma com a finalidade de ativar o sistema imune do paciente⁴⁵.

O adenovírus e as oncoproteínas E6/E7 do HPV interagem com proteínas reguladoras similares para modular o ciclo celular. A proteína E1a do adenovírus é a primeira unidade transcrita e seus produtos são componentes-chave para a replicação adenoviral bem-sucedida. A região CR1 da proteína E1a de adenovírus mostrou-se ligada a p300, que então interage e suprime a função de p53⁴⁶. Além disso, a região CR2 da proteína E1a é capaz de interromper a interação entre o complexo pRb-E2F, tornando a proteína retinoblastoma incapaz de realizar suas funções normais do ponto de controle do ciclo celular^{47,48}. Ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados em flancos de camundongos nus para analisar a eficiência de transdução dos vetores e a viabilidade celular após a infecção viral e os resultados demonstraram efeitos antitumorais com redução no crescimento tumoral apontando para o surgimento de uma nova modalidade de tratamento para a doença⁴⁵.

Nossa pesquisa ainda revelou que 84,61% dos pacientes que tinham câncer de cabeça e pescoço com resultados positivos para o vírus HPV possuíam

ocupações profissionais que também os deixavam expostos a uma variedade de compostos e subprodutos químicos. Trabalhadores rurais, em suas atividades diárias, estão em constante exposição à luz solar além de contato com substâncias carcinogênicas, contribuindo para aumentar o risco relativo de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço e de cavidade oral^{29,49,50,51}. Este dado é corroborado pelo estudo de Conway *et al.*⁵² que aponta que atividades ocupacionais manuais, baixa renda, baixa classe sócio-ocupacional, baixa escolaridade e desemprego estão correlacionados com o desenvolvimento da doença.

Uma das limitações do estudo foi o baixo número de amostras, uma vez que foram insuficientes para determinar quais variáveis socioeconômicas e de características do câncer seriam significativas quanto à presença ou não do HPV. Trinta e duas amostras foram excluídas do estudo em virtude de serem provenientes de pacientes com recidiva do tumor, ou por terem sido submetidos a qualquer tipo de transplante anteriormente.

É importante salientar que o câncer de cabeça e pescoço é cada vez mais prevalente na população, e a definição de sua etiologia é de suma importância para sua prevenção e detecção precoce na população de maior risco. No entanto, são necessários mais estudos na população idosa para avaliar como o sistema imunológico envelhecido reage frente às infecções virais.

Por fim, além de métodos diagnósticos e terapêuticos, é de suma importância que, dentro da rotina de gestão da saúde, aconteça o monitoramento da morbimortalidade por câncer a fim de incorporar ações de prevenção e controle do câncer de cabeça e pescoço assim como de seus fatores de risco. É fundamental não cessar o investimento em campanhas educativas governamentais que alertem sobre os riscos do álcool, tabaco e doenças sexualmente transmissíveis em escolares e incentivar programas preventivos visando um estilo de vida saudável, além de facilitar a participação em programas de tratamento. Também é preciso controlar e estabelecer regras de comercialização e utilização social do álcool e aumentar o número de pesquisas sobre o câncer e vírus.

6. CONCLUSÃO

- Foi encontrada a presença do vírus HPV em 19,11% das amostras estudadas. Sendo 35% das amostras à fresco e 12,5% das amostras parafinadas;
- A caracterização de nossa população de estudo foi composta por homens (82,35%), brancos (89,70%), casados (64,70%);
- A prevalência dos fatores de risco foi de 80,88% para o tabaco e de 60,30% para o álcool;
- A localização do tumor nos pacientes que possuíam o HPV foi mais prevalente na regiões de laringe (61,54%) e cavidade oral (30,77%), enquanto que nos HPV - , a prevalência foi maior entre os de orofaringe (41,82%);
- Os estágios III e IV foram os mais prevalentes: 23,08% e 46,15% entre os HPV+ e 18,18% e 40% entre os HPV - ;
- Não houve correlação da presença do vírus HPV com as demais variáveis explanatórias, no entanto as variáveis idade, consumo de álcool e estadiamento mostraram uma evidência de que a proporção de HPV positivo seja menor em idosos; de que o estadiamento não é influente quanto a condição de HPV positivo e de que o consumo de álcool possui 4,5 vezes mais chance de ter HPV.

Considerações finais

Ainda se faz necessário verificar o impacto clínico causado por estas infecções virais nos pacientes adultos e idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço com a finalidade de prevenir a perda da capacidade funcional que poderá culminar em fragilidade e diminuição da qualidade de vida com o avanço da doença

Os profissionais de saúde devem atentar para os requisitos de humanização e acolhimento do paciente, especialmente entre os mais idosos quando forem comunicar a doença. A comunicação é um processo dinâmico que permite que as pessoas se tornem acessíveis umas às outras através da troca de sentimentos, opiniões, experiências e informações.

Sob o olhar gerontológico é preciso estabelecer uma relação respeitosa, chamando-os pelo nome e mantendo contato visual, levando em consideração possíveis declínios auditivos e/ou visuais. Utilizar linguagem clara e simples, sem uso de termos técnicos que possam não ser compreendidos ou que possam causar confusão a fim de que haja entendimento e compreensão sobre o assunto abordado e garantir que as informações e orientações fornecidas serão seguidas. Além disso, é preciso ter prudência na escolha das palavras utilizadas para comunicar a doença que garanta uma atenção humanizada.

Antes de concluirmos este estudo é imprescindível nortear futuras pesquisas com intuito de gerar novos conhecimentos, trazer inovação e oferecer ações metodológicas que possam contribuir ao estudo sobre o câncer de cabeça e pescoço, especialmente entre os idosos. Por conseguinte, sugerimos:

- ☞ Incluir a investigação de tipos virais no momento da coleta de material com análise anatomopatológica e genotipagem para selecionar os casos positivos e negativos, bem como identificar os HPVs de baixo e alto risco;
- ☞ Investigar as propriedades biológicas e imunológicas dos tumores HPV positivos para uma melhora da resposta ao tratamento;

- ☞ Aumentar o número de estudos sobre a imunosenescência, a fim de avaliar como o sistema imunológico do paciente idoso envelhece e reage frente às adversidades;
- ☞ Delinear estudos longitudinais para avaliar como a vacinação de HPV aplicada em crianças pode prevenir também a infecção orofaríngea;
- ☞ Incluir medidas de saúde bucal e de qualidade de vida aos estudos de oncologia geriátrica;
- ☞ Contemplar variáveis de estudo que possam abranger questões relacionadas ao estilo de vida, como a inclusão de uma alimentação saudável, a prática de exercícios físicos, a redução de peso corporal, cessação de hábitos de beber e fumar nos impulsionam a trocar informações com outros profissionais de saúde, em benefício do paciente;
- ☞ Criar plataformas digitais que facilitem o armazenamento de informações clínicas e sociodemográficas dos pacientes, com campos obrigatórios de preenchimento para que possam resultar em produção científica de alta qualidade e confiabilidade;
- ☞ Construção de instrumentos de pesquisas que facilitem a comunicação entre paciente e profissional de saúde no momento de revelar o diagnóstico;
- ☞ Avaliar quais os impactos sofridos pelo paciente oncológico, família e cuidador e quais suas implicações em relação ao cuidado e recuperação.

Estudos futuros acerca dos fenômenos moleculares que acompanham carcinogênese e os eventos que caracterizam o comportamento de malignidade de uma neoplasia podem colaborar ainda mais para os avanços no diagnóstico e prognóstico das lesões. O entendimento de tais fenômenos esclarecerá os mecanismos etiológicos e biológicos do câncer e permitirá progressos importantes no diagnóstico, na terapêutica, na assistência e na melhoria da qualidade de vida de pacientes adultos e idosos.

7. REFERÊNCIAS

1. Quintero, K *et al.* Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J. otorhinolaryngol.* São Paulo, v. 79, n. 3, May/June 2013.
2. Carvalho, SHG *et al.* Levantamento Epidemiológico dos Casos de Câncer de Boca em um Hospital de Referência em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, 12(1): 47-51, jan./mar., 2012.
3. Demathe, A *et al.* Human papillomavirus (HPV) detection in lip squamous cell carcinoma: correlation with clinical aspects and risk factors. *Rev. bras. epidemiol.*, São Paulo , v. 14, n. 1, Mar. 2011.
4. Castro, TPPG *et al.* Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo, v. 72, n. 2, Apr. 2006.
5. Vargas-Ferreira, F *et al.* Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz. Dent. J.*, Ribeirão Preto, v. 23, n. 5, Oct. 2012.
6. Bittar, TO *et al.* Epidemiological features of oral cancer – a world public health matter. *RFO*, Passo Fundo, v. 15, n. 1, p. 87-93, janeiro/abril, 2010.
7. Vidal, AKL *et al.* HPV detection in oral carcinomas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, Feb. 2004.
8. Ferraro, CTL. *et al.* Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 451-459, agosto, 2011.

9. Leto, MGP. *et al.* J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):306-17.
10. Tristão, W. *et al.* Estudo epidemiológico do HPV na mucosa oral por meio de PCR. *Braz. j. otorhinolaryngol.*, São Paulo, v. 78, n. 4, Aug. 2012.
11. Souto, R. *et al.* O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Goiânia; v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.
12. Best SR, Niparko, KJ, Pai SI. Biology of HPV infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 45, n. 4, p. 807-822, 2012.
13. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathology* 2012, 6(1): 3-15.
14. Alba A, Cararach M, Rodríguez-Cerdeira C. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. *The Open Dermatology Journal*, v. 3, p. 90-102, 2009.
15. Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*, 2008; 27(18):2532-41.
16. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncology*, 2013.
17. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Olson O, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal* 1991; 60(6):1445-56.

18. Favre M, Ramoz N, Orth G. Human Papillomaviruses: general features. *Clinics in Dermatology* 1997;15(2): 181-98.
19. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
20. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. Biologia molecular do câncer cervical. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2006; 6(4):447-451.
21. Chung CH, Gillison ML. Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Its Role in Pathogenesis and Clinical Implications. *Clin cancer Res* 2009;15(22):6758-62.
22. Lima MAP, Silva CGL, Rabenhorst SHB. Papel das proteínas precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. *Revista brasileira de Cancerologia* 2013;59(4):565-73.
23. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro:INCA, 2015.122p.
24. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman C, Redmond KP, Gillison ML. Human Papillomavirus and survival of patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35.
25. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) - 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras (INPAD), UNIFESP. 2014.
26. Laranjeira RR, Pinsky I, Zaleski M, Caetano R. I Levantamento Nacional sobre padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007.

27. Turatti E, Nuto SAS, Bandeira MAC, Barros IAS, Falcão GS. Estudo dos fatores de risco no desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal. *Revista Brasileira de Pesquisa em saúde*. 2012; 14(2):12-19.
28. Barnes L, Eveson, JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
29. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JÁ, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and Neck câncer: causas, prevenção ant treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2):239-47.
30. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1995; 63:769-73.
31. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME *et al*. Risk factors for oral câncer in Brazil: a case control study. *Int J Cancer* 1989; 43:992-1000.
32. Rapoport A, Kowalski LP, Herter NT, Brandão LG, Walder F. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do câncer de boca. *Assoc Med Bras e Cons Fes Med* 2001;1:3-5.
33. Organização Mundial da Saúde. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde - CID-10. Disponível em: <www.datasus.gov.br/cid10/V2008/cid10.htm> Acesso em: 04 de julho de 2017.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6ªed – Rio de Janeiro:INCA,2004. 254p.
35. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2011, disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54 Acesso em: 03 de julho de 2017.

36. IARC Publications Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours World Health Organization Classification of Tumours Chapter 4 <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php>> Acesso em: 03 de julho de 2017.
37. Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 325-333.
38. Gillison ML, Koch WM, Capone RB *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J. Natl Cancer Inst 2000;92:709-20.
39. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R *et al.* Casecontrol Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. New Engl J Med 2007;356(19):1944-1956.
40. Martins Filho PRS, Piva MR, Santos TS, Andrade ESS, Silva LCF. Papiloma de células escamosas da cavidade oral. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilofac, Camaragibe 2009, jul/set.2009; 9(3):69-78.
41. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR. Pesqui. Odontol. Bras. 2001;15(4):314-19.
42. Petersen I, Klein F. HPV bei nichtgynäkologischen Tumoren. Der Pathologe November 2008; 29 (2):118-22.
43. D'Abramo CM, Archambault J. Small Molecule Inhibitors of human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. Open Virol J. 2011; 5:80-85.
44. Larocca CJ, Han J, Salzwedel AO, Davydova J, Herzberg MC, Gopalakrishnan R, Yamamoto M. Oncolytic adenoviruses targeted to Human

- Papilloma Virus-positive head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*. 2016 May 1; 56:25-31.
45. Malajovich MAM. *Biotecnologia* 2ªed.cap 20:264-277, 2016. *In: Biotecnologia: ensino e divulgação* (<http://bteduc.com>).
46. Sang N, Avantaggiati ML, Giordano A. Roles of p300, pocket proteins, and hTBP in E1A-mediated transcriptional regulation and inhibition of p53 transactivation activity. *J Cell Biochem*. 1997; 66:277–85.
47. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, *et al.* Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:4549–53.
48. Whyte P, Williamson NM, Harlow E. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*. 1989; 56:67–75.
49. Dietz A, Ramroth H, Urban T *et al.* Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study. *Int J Cancer* 2004; 10:907-11.
50. Parent ME, Siemiatycki J, Fritschi L. Workplace exposures and esophageal cancer. *Occup Environ Med* 2000; 57:325-34.
51. Vaughan TL. Occupation and squamous cell cancers of the pharynx and sinonasal cavity. *Am J Ind Med* 1989; 16:493-510.
52. Conway DI, McMahon AD, Smith K, Black R, Robertson G, Devine J, *et al.* Components of socioeconomic risk associated with head and neck cancer: a population-based case-control study in Scotland. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 48(1):11-7.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação da pesquisa pela Plataforma Brasil

Plataforma Brasil

aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/administrador/44/Novo/detalharProjetoRfCCentroPartCop.jsf

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Publico Pesquisador Alterar Meus Dados

Stella Vidal de Souza Torres - Pesquisador | V3.0
Sua sessão expira em: 35min 29

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de herpesvírus humano (HHV) e papilomavírus humano (HPV) em pacientes adultos e idosos com diagnósticos de neoplasias de cabeça e pescoço.
 Pesquisador Responsável: Stella Vidal de Souza Torres
 Área Temática:
 Versão: 3
 CAAE: 15300213.0.0000.5404
 Submetido em: 04/04/2014
 Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: UNICAMP - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - FCMUNICAMP
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_153862

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

LISTA DE CENTROS PARTICIPANTES E COPARTICIPANTES

HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	07/04/2014 01:02:23	Parcer liberado			Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas	
PO	07/04/2014	Parcer do colegiado			Comitê de Ética em Pesquisa da	Comitê de Ética em Pesquisa da	

Windows 7 taskbar: Pergunte-me alguma coisa, 16:05, 21/03/2017

ANEXO 2 - Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de herpesvírus humano (HHV) e papilomavírus humano (HPV) em pacientes adultos e idosos com diagnósticos de neoplasias de cabeça e pescoço.

Pesquisador: Stella Vidal de Souza torres

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 15380213.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 606.195

Data da Relatoria: 14/04/2014

Apresentação do Projeto:

Finalidade do projeto: tese de doutorado.

Trata-se de estudo observacional de corte transversal, controlado, sobre a avaliação clínica da saúde bucal e a detecção de herpesvirus humanos e papillomavirus como possíveis agentes etiológicos da doença em pacientes com idade entre 45 e 75 anos, inscritos no programa de atendimento ao tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço dos ambulatórios do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas FCM/UNICAMP.

Os dados dos pacientes serão comparados aos dados de um grupo controle, composto por indivíduos com recomendação de cirurgia odontológica que envolva a retirada de tecido gengival.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Verificar a presença de vírus Epstein-Barr (EBV), HCMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 e HPV em pacientes idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (PCR-nested).

Objetivo Secundário:

1. Caracterizar a população de estudo segundo as características sócio-demográficas e tumorais, como o tipo histopatológico, localização anatômica, estadiamento e tratamento.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887

UF: SP Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 606.195

2. Identificar a frequência dos fatores de risco associados a etiologia do câncer de cabeça e pescoço.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previsíveis para os participantes da pesquisa.

Benefícios:

não há benefício em participar da pesquisa, apenas o fato de poder ajudar na melhoria do conhecimento sobre o câncer de cabeça e pescoço.

Estas informações estão presentes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), a ser aplicado aos participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critérios de Inclusão:

- Indivíduos entre 45 e 75 anos, de qualquer sexo; que vivam na comunidade; que estejam funcionalmente independentes; que tenham recebido o diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço pela primeira vez e que ainda não tenham se submetidos ao tratamento oncológico proposto pelo médico.

Critério de Exclusão:

- Pacientes que tenham história pregressa de câncer; tenham sido transplantados no último ano e que tenham apresentado doenças do sistema imunológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do projeto de pesquisa gerado pela PB, foi apresentado protocolo do pesquisador com detalhamento dos aspectos técnicos do estudo. A folha de rosto encontra-se devidamente preenchida e assinada pelo pesquisador e pela responsável do Hemocentro/Unicamp. Foi apresentado TCLE reformulado, contemplando tanto os pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço quanto participantes não portadores de neoplasias, que apresentam indicação de cirurgia odontológica e retirada de tecido gengival. Na forma atual, TCLE reformulado está adequado, com identificação precisa dos pesquisadores, apresentação do projeto de forma objetiva e compreensível, com esclarecimentos sobre a participação voluntária, confidencialidade, descrição dos procedimentos e seus riscos e possíveis benefícios.

Foi apresentado o regulamento de biorrepositório responsável pela guarda de material biológico, o qual já foi aprovado por este CEP.

Recomendações:

--

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 606.195

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos requisitos para sua aprovação, segundo os critérios do sistema CEP-CONEP e a Resolução CNS 466-2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

CAMPINAS, 07 de Abril de 2014

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 3 - Aprovação da emenda da pesquisa para utilização de amostras parafinadas pela Plataforma Brasil.

The screenshot displays the 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' page in the Plataforma Brasil system. The browser address bar shows the URL: `aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf`. The page header includes the 'Saúde Ministério da Saúde' logo and the 'Plataforma Brasil' logo. Navigation buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados' are visible. The user is identified as 'Stella Vidal de Souza torres - Pesquisador | V3.0' with a session expiration of 39min 31.

The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA' with the following details:

- Título da Pesquisa: Detecção de herpesvirus humano (HHV) e papilomavirus humano (HPV) em pacientes adultos e idosos com diagnósticos de neoplasias de cabeça e pescoço.
- Pesquisador Responsável: Stella Vidal de Souza torres
- Área Temática:
- Versão: 10
- CAAE: 15380213.0.0000.5404
- Submetido em: 15/05/2015
- Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP
- Situação da Versão do Projeto: Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
- Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of the project details. At the bottom right, there is a 'Comprovante de Recepção' link with a PDF icon and the file name 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_471269'.

ANEXO 4 - Aprovação da emenda da pesquisa para utilização de amostras parafinadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de herpesvírus humano (HHV) e papilomavírus humano (HPV) em pacientes adultos e idosos com diagnósticos de neoplasias de cabeça e pescoço.

Pesquisador: Stella Vidal de Souza torres

Área Temática:

Versão: 10

CAAE: 15380213.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.083.446

Data da Relatoria: 26/05/2015

Apresentação do Projeto:

Parecer de apreciação de EMENDA ao projeto original que tem aprovação deste CEP em 07-04-2014.

Justificativa da EMENDA:

"Emenda encaminhada em função da inclusão de amostras parafinadas ao estudo original em decorrência da insuficiência de quantidades significativas de material de biópsias de tecido à fresco relacionado à pesquisa e que pudessem ser incorporados satisfatoriamente. Acreditamos que, com a utilização destas novas amostras poderemos atingir o número proposto inicialmente de amostras do projeto."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Verificar a presença de vírus Epstein-Barr (EBV), HCMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 e HPV utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (PCR-nested) em pacientes idosos com diagnóstico de neoplasia de cabeça e pescoço;

Objetivo Secundário:

1. Caracterizar a população de estudo segundo as características sócio-demográficas, aspectos tumorais como o tipo histopatológico, a localização anatômica, o estadiamento e o tratamento do

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.083.446

tumor.2. Identificar a frequência dos fatores de risco associados a etiologia do câncer de cabeça e pescoço;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada é alterado em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Resposta as pendências emitidas no parecer CEP número 902.182.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Resposta as pendências emitidas no parecer CEP número 902.182.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Resposta as pendências emitidas no parecer CEP número 902.182:

Em Relação ao Cronograma:

1- O item "Entrevista com os participantes e coleta de material biológico, com início em 01/07/2013 e término em 30/06/2014. Como a aprovação do projeto foi apenas em 07-04-2014 ESCLARECER.

Resposta:Segundo a pesquisadora: "As datas referentes a entrevista com os participantes e coleta de material biológico", com início em 01/07/2013 e término em 30/06/2014 não se deu pelo fato de que o projeto foi enviado à Plataforma Brasil em abril/2013e esperávamos que até julho já houvesse aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética, sendo que isto só ocorreu um ano depois, ou seja em 07/04/2014. Não havendo, em nenhum momento, solicitação por parte dos relatores de alteração desse cronograma ao longo do processo".

Análise:Pendência atendida.

2- Não refere no cronograma a fase de avaliação do material em blocos de parafina.

Emenda não considera se haverá alteração da análise do projeto, sendo que com o novo grupo de casos não haverá entrevista. Qual a casuística já obtida?

Resposta:Segundo a pesquisadora: "Quanto à fase de avaliação do material em blocos de parafina, a mesma também não foi colocada no cronograma inicial por não haver previsão de uso inicialmente. A necessidade de incorporação destas amostras ao projeto, tem como finalidade a de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.083.446

umentar a casuística e poder proporcionar resultados mais expressivos ao estudo. Estas novas amostras serão de biópsias de pacientes adultos e idosos com neoplasias de cabeça e pescoço, emblocadas em parafina e arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica sob a responsabilidade da Prof.^a Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani (autorização anexada anteriormente). Por serem amostras de arquivo, não haverá necessidade do Termo de consentimento Livre e Esclarecido. Por este motivo, solicitamos a dispensa do mesmo apenas para este grupo de amostras parafinas.

Em relação à alteração da análise do projeto não haverá mudança com a inclusão das amostras emblocadas em parafina, pois o objetivo geral será o mesmo, ou seja, a detecção dos vírus de estudo, não havendo necessidade de entrevista. Em relação a casuística, o estudo obteve até o momento 28 casos dos 100 inicialmente propostos".

Análise: Pendência atendida.

3-O Cronograma Coleta de dados já realizada.

Resposta: Segundo a pesquisadora: "A coleta de dados foi apenas com os tecidos à fresco, obtendo-se 28 amostras, havendo a necessidade de retomar o estudo com os tecidos emblocadas levando-se para isso cerca de duas semanas para conclusão".

Análise: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 28 de Maio de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 5 - Ficha clínica elaborada para a pesquisa para a coleta de dados em prontuários médicos.

Nome:	
HC:	Número do Bloco:
Sexo:	Raça:
Idade:	Data de Nascimento:
Cidade:	Estado:
Profissão:	Escolaridade:
Tipo de tumor:	
Laudo:	
Localização:	Tamanho:
Estadiamento:	
Tratamento:	
Tabagista:	
Etilista:	
Medicamentos:	
Doenças relatadas:	

ANEXO 6 - Autorização da Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica para incluir o artigo 1 na Tese.



São Paulo, 13 de julho de 2017.

AUTORIZAÇÃO DE REPRINT

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prezados Senhores,

Informamos pelo presente documento que a **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica** autoriza o **reprint** do Artigo de Revisão intitulado: “**A importância do diagnóstico precoce de câncer bucal em idosos**”, publicado na edição de jan/março de 2016, volume 14, número 1.

A presente autorização é válida somente para **Defesa de Tese** de Stella Vidal de Souza Torres.

Atenciosamente.

Antonio Carlos Lopes
Editor

Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica

www.sbcm.org.br

Rua Botucatu, 572 cj. 112 04023 061 São Paulo SP
+55 11 5908 8385 Fax: +55 11 5908 8381 sbcm@sbcm.org.br

ANEXO 7 - Declaração de não infringir a lei autoral**DECLARAÇÃO**

A cópia do artigo de minha autoria já publicado em revista que consta em minha Tese de Doutorado intitulada **"PRESENÇA DE DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM BIÓPSIAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PACIENTES ADULTOS E IDOSOS COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO"** não infringe o dispositivo da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de julho de 2017.



Autora: Stella Vidal de Souza Torres

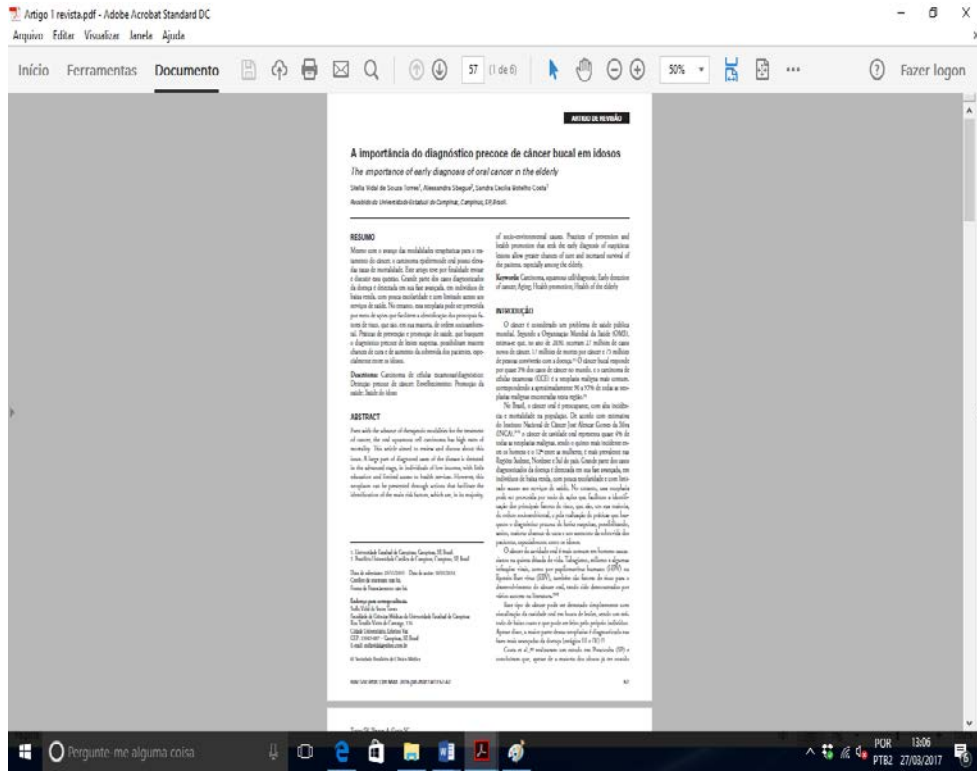
RG: 18.080.143-0



Orientadora: Sandra Cecília Botelho Costa

RG: 5077416

ANEXO 8 - Comprovante de publicação do Artigo 1 na Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica.



ANEXO 9 – Comprovante de submissão do Artigo 2 à Revista Head & Neck.

Head & Neck



Head and Neck

Presence of human papillomavirus DNA in head and neck squamous cells carcinoma biopsies from adults and elderly patients

Journal:	Head & Neck
Manuscript ID	HED-16-1378
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Dec-2016
Complete List of Authors:	Torres, Stella Vidal de Souza; State University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Gerontology Postgraduate Sbeque, Alessandra; Pontifical Catholic University of Campinas/PUCCAMP, Graduate Medicine Mariano, Fernanda; University of Campinas, Pathology Altemani, Albina; State University of Campinas, Pathology Chone, Carlos; Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Otolaryngology Head and Neck Bonon, Sandra Helena Alves; State University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Laboratory of Virology Costa, Sandra Cecilia Botelho; State University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Internal Medicine; Posgraduate Gerontology
Key Words:	squamous cell carcinoma, human papillomavirus (HPV), head and neck cancer., elderly, Polymerase Chain Reaction (PCR and nested PCR)

SCHOLARONE™
Manuscripts

ScholarOne Manuscripts™

Stella Vidal de Souza Torres Instructions & Forms Help Log Out

WILEY Head and Neck

Home Author Review

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts
- Start New Submission
- Legacy Instructions
- 5 Most Recent E-mails
- English Language Editing Service

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ME: Crapanzano, Mariann Submitted	HED-16-1378	Presence of human papillomavirus DNA in head and neck squamous cells carcinoma biopsies from adults and elderly patients View Submission	08-Nov-2016	02-Dec-2016

Pergunte-me alguma coisa

POR 00:54
PTB 03/12/2016

ANEXO 10 – Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: “Detecção de herpesvírus humano (HHV) e papilomavírus humano (HPV) em pacientes adultos e idosos com diagnósticos de neoplasias de cabeça e pescoço”.

Nome do responsável: Stella Vidal de Souza Torres

Contato: Laboratório de Vírus: (19) 3521-7734

E-mail: svstorres@yahoo.com.br

Número do CAAE: 15380213.0.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como VOLUNTÁRIO de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa orientá-lo sobre a pesquisa da qual irá participar e assegura seus direitos e deveres como participante. É elaborado em duas vias que deverão ser assinadas tanto pelo participante como pela pesquisadora, ficando cada um com uma via.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com a pesquisadora. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo de seu atendimento na unidade em que tem recebido tratamento.

Justificativa e objetivos: este estudo tem como objetivo a pesquisa de seis tipos de vírus que podem ser encontrados na mucosa oral e utilizará métodos laboratoriais para detectá-los. Indivíduos adultos e idosos na faixa etária de 45 a 75 anos que não apresentam evidências de câncer de cabeça e pescoço serão comparados a outro grupo na mesma faixa etária composto por indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço. Esta comparação permite o conhecimento a respeito destes vírus e a possibilidade de verificar se os mesmos estão envolvidos no surgimento do câncer em algumas pessoas.

Procedimentos: para os indivíduos que não tem evidências de câncer de cabeça e pescoço, a participação nessa pesquisa só se dará se por indicação do dentista, for realizado algum tipo de cirurgia odontológica, que envolva retirada de tecido gengival. Nesse caso, parte deste material será utilizada em nosso estudo para a verificação de vírus.

Desconfortos e riscos: este procedimento será realizado pelos dentistas no próprio Ambulatório do Serviço de Odontologia do Hospital de Clínicas da Unicamp seguindo, rigorosamente, o planejamento do seu tratamento de modo que não haverá qualquer prejuízo à sua saúde. Nenhum risco é esperado pela participação na pesquisa.

Benefícios: não há benefício em participar da pesquisa, apenas o fato de poder ajudar na melhoria do conhecimento sobre o câncer de cabeça e pescoço.

Acompanhamento e assistência: você sempre terá a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer suas dúvidas com a pesquisadora quanto à realização dos procedimentos da pesquisa, mesmo que venha a desistir da pesquisa a qualquer momento. Não está previsto acompanhamento por parte da pesquisadora e não haverá nenhum resultado de exame a ser entregue ao participante.

Sigilo e privacidade: você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos

resultados deste estudo, seus dados não serão citados.

Ressarcimento: como a pesquisa se dará nos horários de suas consultas de rotina não haverá necessidade de ressarcimento de despesas e também não haverá nenhum pagamento pela sua participação.

Armazenamento de material: as amostras de material coletados dos participantes serão armazenadas em freezer a uma temperatura de -80°C, sob a responsabilidade do Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp seguindo as normas da Resolução 347, como fonte de material biológico para ser utilizado em pesquisa. Qualquer estudo a ser realizado no futuro com essa amostra do material coletado na sua cirurgia só poderá ser feito após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Para isso, você terá a opção de aceitar ou não participar desta pesquisa, concordando ou não, que o material biológico obtido de seu tratamento odontológico seja armazenado para a utilização em pesquisas futuras:

() Concordo participar desse estudo, mas não concordo que o material coletado da minha cirurgia odontológica seja armazenado para pesquisas no futuro. Quero que ele seja eliminado após o término desse estudo.

() Concordo em participar deste estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso pela CONEP.

() Concordo em participar deste estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com:

Stella Vidal de Souza Torres, Laboratório de Vírus/FCM/UNICAMP
Rua Vital Brasil, 251 – Cidade Universitária – 2º andar do HC
Fone: (19) 3521-7734 – E-mail: svstorres@yahoo.com.br

Profª Sandra Cecilia Botelho Costa, departamento de Clínica Médica/ FCM/Unicamp - Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas – SP – Brasil – CEP: 13083-887
Fone: (19) 3521-9215 – E-mail: costa@fcm.unicamp.br

Profª Sandra Helena Alves Bonon, Laboratório de Vírus/FCM/Unicamp
Rua Vital Brasil, 251 – Cidade Universitária – 2º andar do HC
Fone: (19) 3521-7734 – E-mail: sandrabonon@gmail.com

Declaro que recebi todos os esclarecimentos e esclareci minhas dúvidas sobre a pesquisa, bem como sobre a utilização desta documentação para fins acadêmicos e científicos.

Nome do participante ou responsável legal: _____
HC: _____ Documento: _____ Data de nascimento: _____
Endereço: _____
CEP: _____ Fone: () _____

Assinatura do Paciente ou Responsável legal
Campinas, ___/___/___.

A assinatura deste documento indica a minha participação como voluntário desta pesquisa. Também indica que recebi uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida sobre os aspectos éticos da pesquisa ou reclamações da sua participação, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 CEP: 13083-887 – Campinas/SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Responsabilidade do Pesquisador: Asseguro ter cumprido as exigências da Resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste TCLE. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura do pesquisador

data / /