



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013

**Marlene Duarte
Esteves**

**Infeção por HPV e EBV em tumores de
cabeça e pescoço**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013

**Marlene Duarte
Esteves**

Infeção por HPV e EBV em tumores de cabeça e pescoço

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor Hugo Manuel Lopes Sousa, Grupo de Oncologia Molecular, Instituto Português de Oncologia Porto FG EPE, e do Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, professor Associado da Escola Superior de Saúde da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Carlos Lopes

Professor Associado do Instituto de Ciência Biomédicas Abel Salazar

Professor Doutor Hugo Manuel Lopes Sousa

Grupo de Oncologia Molecular – Centro de Investigação, Instituto Português de Oncologia do Porto FG EPE

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Doutor Hugo Manuel Lopes Sousa, por toda a ajuda, disponibilidade, motivação e paciência prestadas no decorrer desta dissertação. Pelo apoio incondicional que estimulou a minha vontade de querer, sempre, saber mais e fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de integrar no seu Grupo de Investigação, e reconheço com gratidão, não só a confiança que depositou em mim desde o início, mas também o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do projeto.

Ao meu co-orientador, professor Doutor Francisco Amado, por estar sempre disponível para ajudar e ter contribuído para enriquecer os meus conhecimentos científicos.

Às minhas colegas de laboratório Joana Ribeiro e Joana Marinho Dias, por me terem ajudado quando mais precisei. Um especial obrigado a ti, Joana Ribeiro, não só por me teres ensinado grande parte daquilo que sei e por estares sempre disponível para ajudar em qualquer situação, mas também pelos momentos de descontração. A tua amizade foi essencial na minha integração e no meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de laboratório mais novos, Liliana Raeiro, Mariana Malta, Joana Silva, Marco Neves, Letícia Mesquita, Andreia Oliveira e Isabel Paiva, por me terem ajudado nos momentos de mais pressão. Um especial obrigado a ti, Andreia Oliveira, porque mesmo quando não me estavas a ajudar, ficavas comigo até que horas fossem, só para me fazeres companhia. Foste um apoio muito importante quando o *stress* começou a fazer-se notar.

Ao Doutor Alexandre Ferreira, por ter sido um elo de ligação fundamental entre a Universidade de Aveiro e o IPO, Porto.

À minha família, especialmente ao meu pai, mãe e irmã por serem o meu suporte e me apoiarem em todos os momentos, sem eles teria sido impossível ter chegado a esta fase.

Aos meus amigos, especialmente à Fátima, Daniela e Sílvia, por todos os bons momentos passados que ajudaram a distrair quando tudo parecia impossível.

Ao Doutor Eurico Monteiro, Doutor Eduardo Breda e enfermeira Anabela Machado, do serviço de Otorrinolaringologia do IPO Porto, pela disponibilidade em ajudar na realização deste projeto.

Ao Doutor Rui Henrique, Doutor Manuel Jácome e Técnica Ana Tavares da Anatomia Patológica do IPO Porto, por terem colaborado na realização deste projeto.

PALAVRAS – CHAVE:

Cancro de cabeça e pescoço, Vírus do papiloma humano, Vírus Epstein-Barr, carcinogénese

RESUMO:

O cancro de cabeça e pescoço é o quinto com maior incidência em Portugal e representa um grave problema de saúde pública com cerca de 43 000 novos casos por ano. Adicionalmente ao tabaco e álcool, os vírus foram também associados ao desenvolvimento deste tipo de patologias, nomeadamente o Vírus do Papiloma Humano e o Vírus Epstein-Barr.

Os objetivos deste estudo foram caracterizar a prevalência da infeção pelo EBV e HPV nos tumores de cabeça e pescoço; comparar a prevalência viral nas diferentes amostras; e avaliar a presença de DNA viral na saliva como possível biomarcador preditivo do cancro de cabeça e pescoço.

O estudo foi realizado em 68 doentes (3 mulheres e 65 homens) diagnosticados com HNC, com uma idade mediana de 55 anos (34-87). A infeção por HPV foi detetada em DNA de amostras de saliva e tecido por PCR. A deteção de EBV foi feita usando um protocolo *in house* de PCR em tempo real.

A frequência geral da infeção na saliva foi 2.9% (2/66) para o HPV e 74.2% (49/66) para o EBV. Nos tecidos a prevalência da infeção foi 7.1% (3/40) para o HPV e 52.4% (22/40) para o EBV. Apesar de apenas existirem 2 casos positivos na saliva e 3 nos tecidos, a genotipagem revelou 4 casos positivos para HPV 16.

Observamos que não existe excreção de HPV na saliva dos doentes com carcinomas HPV negativos, enquanto que em 2 dos 3 carcinomas HPV positivos observou-se a excreção de HPV, o que nos leva a concluir que a excreção de HPV na saliva deverá ser estudada como um possível marcador de patologia maligna da cavidade oral. Pelo contrário, relativamente ao EBV, concluímos que a excreção de EBV na saliva não pode ser utilizada como biomarcador preditivo da existência de carcinoma de cabeça e pescoço, uma vez que nos casos de carcinoma EBV negativos existe igualmente excreção de EBV na saliva.

KEY-WORDS: Head and neck cancer, Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, carcinogenesis.

ABSTRACT

Head and neck cancer (HNC) is the fifth most frequently in Portugal and is a serious public health problem with almost 43.000 new cases per year. Besides tobacco smoke and alcohol, viruses were associated with the development of HNC, in particular Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus (EBV).

The aim of this study was to characterize the prevalence of HPV, and EBV in saliva and tissue samples of head and neck cancer patients.

This study was performed with 68 patients (3 women and 65 men), diagnosed with HNC with median age 55 years old (range 34-87). Infection of HPV was detected in DNA saliva and tissue by PCR using consensus primers and genotyping was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Detection of EBV was performed using an in house Real time-PCR protocol.

The overall frequency of infection in saliva was 2.9% (2/66) for HPV and 74.2% (49/66) for EBV. In tissues, the prevalence of infection was 7.1% (3/40) for HPV and 52.4% (22/40) for EBV. Despite only 2 positive cases in saliva and 3 in tissues, genotyping revealed 4 cases to be HPV16 positive.

It was observed that there was no excretion of HPV in saliva in patients with HPV negative carcinoma, while in two of the three HPV positive carcinoma occurred excretion of HPV, leading to the conclusion that HPV excretion in saliva must be studied as a possible marker of malignancy of the oral cavity. In contrast, we have concluded that the excretion of EBV in saliva cannot be used as a biomarker predictive of the presence of carcinoma of the head and neck, such as in carcinoma EBV-negative has also occurred excretion of EBV in saliva.

ABREVIATURAS

ASR: *Age-standardize rate*

CFS: Sítios frágeis comuns

CR: Região conservada

DSB: Quebras da cadeia dupla

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EBER: Pequeno RNA nuclear

EBNA: Antígeno nuclear do EBV

EBV: Vírus Epstein-Barr

HBV: Vírus da hepatite B

HCV: Vírus da hepatite C

HHV-8: Herpes Vírus Humano 8

HNC: Carcinoma de cabeça e pescoço

HNSCC: Carcinoma das células escamosas de cabeça-pescoço

HPV: Papiloma vírus humano

HTLV1: Vírus linfotrópico das células T tipo1

Ig: Imunoglobulina

LMP: Proteína de membrana de latência

MH2: Tipo de carcinoma aviário

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF: *Open Reading Frames*

OSCC: carcinoma oral das células escamosas

pRb: Proteína retinoblastoma

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

p16: Proteína supressora tumoral 16

p53: Proteína supressora tumoral 53

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensageiro

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RSV: Virus Sarcoma Rous

SCC: Carcinoma das células escamosas

TRAF: Fator associado aos recetores de necrose tumoral

UMA: Unidade Maço Ano

URR: Região reguladora a montante

WHO: *World Health Organization*

ÍNDICE

I. ESTADO DA ARTE	1
1. CANCRO	1
2. CANCRO CABEÇA-PESCOÇO	4
3. VÍRUS E CANCRO	9
4. OBJETIVOS	24
II. DESENHO DO ESTUDO.....	25
1. TIPO DE ESTUDO.....	25
2. AMOSTRA	26
3. QUESTÕES ÉTICAS	26
III. METODOLOGIA	27
1. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	27
2. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HPV	28
4. CONTROLO DE QUALIDADE.....	33
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
IV RESULTADOS.....	34
1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	34
2. DETECÇÃO DE DNA VIRAL.....	36
V. DISCUSSÃO.....	41
VI. BIBLIOGRAFIA.....	49
VII. ANEXO 1	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Marcas características do cancro	1
Figura 2: Sítios anatómicos da cabeça e pescoço	4
Figura 3: Mapa representativo da incidência de vários tipos de cancro cabeça pescoço em todo o mundo, para ambos os sexos	5
Figura 4: Incidência e mortalidade de diferentes tipos de cancros em Portugal	5
Figura 5: Estrutura genómica do DNA do HPV 16	11
Figura 6: Organização do genoma do HPV e ciclo de vida do vírus	12
Figura 7: Degradação da p53 mediada pela via do proteossoma-ubiquitina	14
Figura 8: Desregulação do ponto de restrição (R) do ciclo celular pela E7	16
Figura 9: Mapa genómico do EBV	19
Figura 10: Esquema representativo da infeção primária e persistente do EBV	21
Figura 11: Carcinogénese do carcinoma da nasofaringe.....	22
Figura 12: Gráfico ilustrativo da distribuição das idades.....	25
Figura 13: Imagem do gel de eletroforese do produto de PCR da Ciclina D1.....	28
Figura 14: Imagem do gel de eletroforese do produto de PCR do MY09/11	28
Figura 15: Imagem do gel de eletroforese do produto de PCR do GP5+/6+	29
Figura 16: Imagem do gel de eletroforese do produto de PCR do HPV16 e 18	30
Figura 17: Imagem do gel de eletroforese do produto de PCR do HPV6 e 11.	30
Figura 18: Imagem representativa da amplificação/deteção de EBV por PCR em tempo real	32
Figura 19: Gráfico representativo da distribuição normal das idades.	34
Figura 20: Gráfico representativo da relação entre a presença de HPV na saliva e nos tecidos tumorais.....	40
Figura 21: Gráfico representativo da relação entre a presença de EBV na saliva e nos tecidos tumorais.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população em estudo.....	35
Tabela 2: Tabela demonstrativa do número de casos positivos e negativos para o HPV. .	37
Tabela 3: Tabela demonstrativa do número de casos positivos e negativos para o EBV. .	39
Tabela 4: Tabela demonstrativa das diferentes metodologias utilizadas por diversos autores na detecção de HPV.....	44
Tabela 5: Tabela demonstrativa das diferentes metodologias utilizadas por diversos autores na detecção de EBV.....	47
Tabela 6: Primers e sonda PCR e PCR em tempo real.....	61

I. ESTADO DA ARTE

1. CANCRO

O desenvolvimento de cancro é um processo multietapas, em que se desenvolvem lesões precursoras que estão associadas a uma probabilidade aumentada de desenvolvimento de uma neoplasia (Dobrossy, 2005).

O cancro resulta de uma proliferação descontrolada das células como resultado de alterações genómicas. Em condições normais, após a ocorrência de um dano genético nas células, estas recorrem à ativação das vias de reparação ou, em casos extremos, de morte celular. No entanto, em certas condições, as células escapam ao processo de reparação celular/apoptose e continuam a proliferar, havendo um aumento no número de células alteradas, que dá origem à formação de uma massa tumoral (Alvarenga, 2010)

O desenvolvimento de cancro tem por base a ativação de vias celulares importantes: escape aos supressores de crescimento, escape à destruição imune, imortalização, promoção da inflamação tumoral, ativação da invasão, indução da angiogénese, instabilidade genómica e mutação, resistência à morte celular, desregulação da energética celular e manutenção da sinalização proliferativa (Figura 1).



Figura 1: Marcas características do cancro (Adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2011)).

Um dos traços fundamentais das células neoplásicas é a sua capacidade de manter um estado proliferativo contínuo, no entanto, o que melhor define o seu perfil maligno é a capacidade destas células metastizarem. Uma célula normal controla rigorosamente a produção e libertação de sinais promotores de proliferação, assegurando o equilíbrio no número de células, mantendo assim a arquitetura e função normais dos tecidos/órgãos. As células neoplásicas tornam-se independentes/autónomas através de novas vias de sinalização transmitidas, em grande parte, pelos fatores de crescimento que se ligam aos recetores da superfície celular. Estes domínios emitem sinais através de vias de sinalização intracelulares, que regulam a progressão do ciclo celular assim como a proliferação celular. A capacidade de sustentar uma sinalização proliferativa pode ser feita através de vários meios: 1) produção de fatores de crescimento, resultando numa estimulação proliferativa autócrina; 2) estimulação das células do estroma do tumor que retribui com o fornecimento de vários fatores de crescimento; e 3) aumento dos níveis de proteínas recetoras, que existem na superfície das células, tornando-as capazes de dar múltiplas respostas. Por outro lado, o mesmo resultado pode surgir de alterações estruturais nas moléculas recetoras, que facilitam o início da resposta independente do ligando. A independência do fator de crescimento pode também derivar da ativação constitutiva dos componentes das vias de sinalização que funcionam a jusante destes recetores, evitando a necessidade de estimular estas vias pela ativação do recetor mediada pelo ligando (Hanahan and Weinberg, 2011). Muitas vezes, estes sinais influenciam também outras propriedades biológicas da célula, como a sobrevivência e o metabolismo.

Existe ainda uma componente genética muito importante associada a alterações em oncogenes e genes supressores tumorais no desenvolvimento do cancro. Estes dois tipos de genes regulam a homeostasia celular e, quando se encontram mutados, levam ao aumento da sobrevivência celular e à proliferação descontrolada. De facto, os cancros exibem, na maioria das vezes, alterações genómicas ativadas por oncogenes, tais como amplificação de genes e mutações pontuais de ganho de função; e/ou mutações que inativam os supressores tumorais, tais como deleções, mutações pontuais de perda de função ou silenciamento epigenético. Estas alterações em conjunto permitem que as células adquiram um fenótipo de proliferação descontrolada que é característico dos cancros (Mullen and Deberardinis, 2012).

De entre todas as formas de provocar alterações celulares, que conduzam a um fenótipo proliferativo/neoplásico, há uma variedade de agentes carcinogénicos com alto potencial. Existem agentes carcinogénicos biológicos, físicos e químicos, entre os quais podemos destacar vírus, radiações ultra-violetas e tabaco, respetivamente. Estes agentes contribuem de uma forma direta ou indireta para as alterações celulares que levam ao desenvolvimento de cancro (Luo et al., 2004, Schwartz et al., 1998a).

2. CANCRO CABEÇA-PESCOÇO

2.1 Epidemiologia

Cancro de cabeça e pescoço é um termo definido para descrever um conjunto de tumores malignos do trato superior aerodigestivo, que incluem a cavidade oral, faringe, nasofaringe e laringe. As várias patologias são frequentemente agrupadas em três grupos: os câncros da cavidade oral (com uma incidência de cerca de 40%) que incluem lábio, a base da língua, a língua, gengiva, boca e palato; faringe (com cerca de 15% de incidência) que envolve a orofaringe, hipofaringe e nasofaringe; e laringe com uma incidência de cerca de 25% (Dobrossy, 2005) (Figura 2).

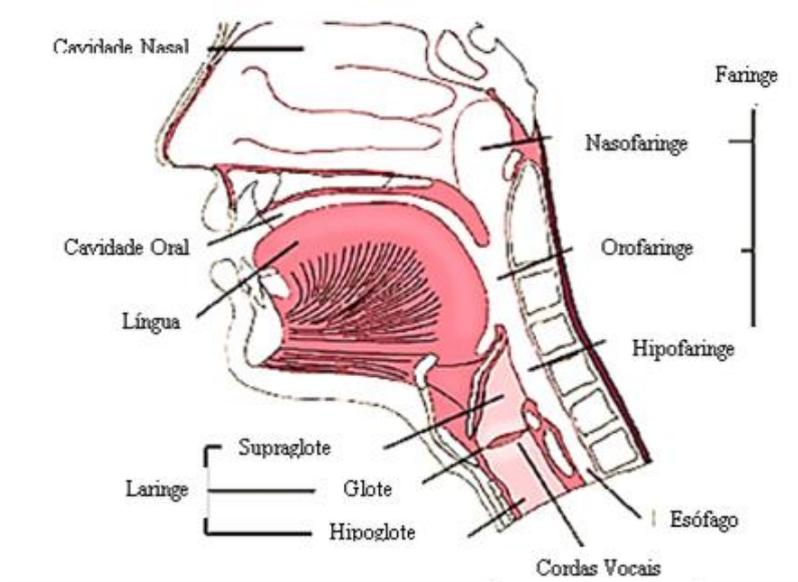


Figura 2: Sítios anatómicos da cabeça e pescoço (Adaptado de Van Houtte, 1994).

O cancro de cabeça e pescoço é um grave problema de saúde pública, representando cerca de 6% de todos os câncros, com cerca de 600 000 novos casos e 350 000 mortes a cada ano (Heck et al., 2010). Como se pode observar na figura 3, que representa a distribuição mundial das incidências dos vários tipos de cancro de cabeça e pescoço para ambos os sexos, existe uma grande heterogeneidade na distribuição destas neoplasias no mundo. As regiões de maior incidência são o sudeste da Ásia e o Oeste da Europa, com uma incidência que varia de 12 a 29 por 100 000 indivíduos, seguido do Norte da Ásia, Oceânia, América do Norte e parte da América do Sul, com uma incidência que varia de cerca de 8 a 12 por 100 000 indivíduos. Globalmente a incidência também é diferente de

acordo com a localização dos tumores: cavidade oral 4,0/100 000, faringe 3,1/100 000 e laringe 2,1/1000 000. A mortalidade é 1,9/100 000, 2,0/100 000 e 1.1/100 000, respetivamente (Ferlay et al., 2010).

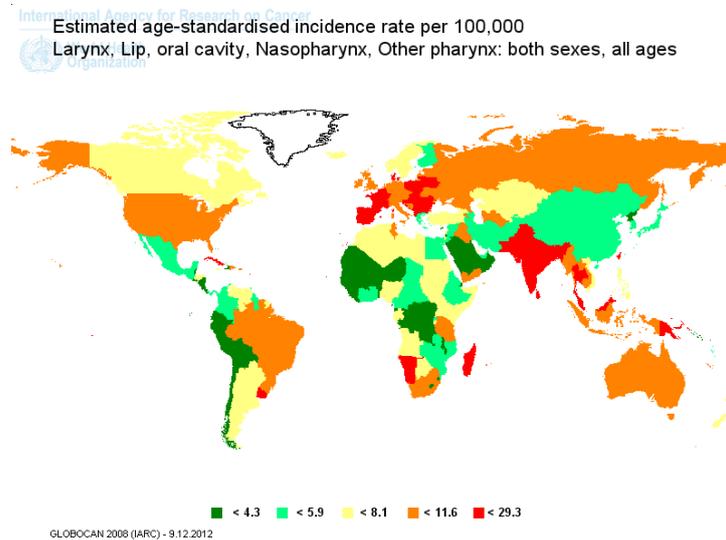


Figura 3: Mapa representativo da incidência de vários tipos de cancro cabeça pescoço em todo o mundo, para ambos os sexos (Ferlay et al., 2010).

Em Portugal, o cancro de cabeça e pescoço é o quinto com maior incidência em ambos os sexos (Figura 4), sendo que o da cavidade oral tem uma incidência de 6,8/100 000 habitantes, faringe 5,0/100 000 e laringe 4,7/100 000. A mortalidade é de 1,9/100 000 na cavidade oral, 2,1/100 000 na faringe e 1,8/100 000 na laringe (Ferlay et al., 2010).

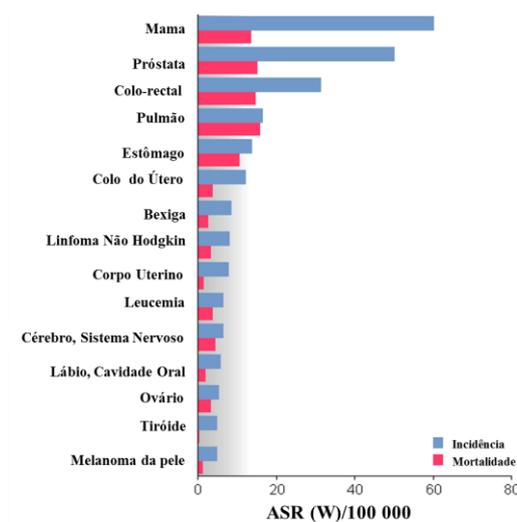


Figura 4: Incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncros em Portugal (Adaptado de Ferlay et al, 2010).

2.2 Etiologia

O desenvolvimento do cancro de cabeça e pescoço é um processo que ainda não está completamente entendido, no entanto existem evidências que sugerem o papel de vários fatores, associados individualmente ou em conjunto, a um risco aumentado da ocorrência deste tipo de cancro. Os fatores de risco estão associados ao comportamento e estilo de vida do indivíduo, ou de acordo com o meio ambiente em que se insere. Assim, os hábitos tabágicos e etílicos, a dieta e outros comportamentos de risco são fatores determinantes para o aumento do risco destas neoplasias (Dobrossy, 2005), sendo que a grande maioria dos cancros das células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) é provocada por uma exposição intensiva ao fumo do tabaco, consumo abusivo de álcool e infeção por alguns vírus (Vírus do papiloma humano, HPV, e Vírus Epstein-Barr, EBV) (Singh, 2008). Isoladamente, cada fator de risco aumenta em duas a três vezes o risco de se desenvolver cancro mas, quando combinados, esse risco aumenta em cerca de quinze vezes (Dobrossy, 2005).

Sabemos que os carcinogénicos existentes no fumo do tabaco são responsáveis pela formação de alterações neoplásicas, induzindo mudanças genéticas, cuja taxa e acumulação está dependente do equilíbrio entre a dosagem de fumo inalado e a suscetibilidade do hospedeiro (Singh, 2008). O alcatrão existente no fumo do tabaco, quando é queimado, promove a formação de uma variedade de componentes, incluindo metilcolantreno, benzopireno e benzantraceno, que são clivados pela enzima aril-hidrocarboneto hidroxilase em epóxidos que se vão ligar ao DNA. O níquel e o pó de cromato são os principais químicos inorgânicos capazes de causar lesões no nariz, laringe, pulmões e nos seios paranasais (de Vries et al., 1991). De facto, existem evidências que estimam que aproximadamente 60% dos cancros orais nos homens e 30% nas mulheres, possam ser atribuídos apenas ao fumo do tabaco (Bray et al., 2002).

Relativamente ao álcool os mecanismos de carcinogénese podem ser diretos e indiretos. Os efeitos diretos do álcool na carcinogénese passam pelo seu metabolismo, com a formação de acetaldeído, pela enzima álcool desidrogenase. Os efeitos carcinogénicos do acetaldeído passam pela ligação ao DNA, e pela alteração da transferência dos grupos metilo, o que resulta numa hipometilação, que vai afetar a transcrição de inúmeros genes. Para além

disto, durante o metabolismo do álcool são formadas espécies reativas de oxigênio, que exercem também efeitos mutagênicos (Singh, 2008).

Alterações nutricionais ou desequilíbrios na dieta podem também desempenhar um papel no desenvolvimento de cancro. As deficiências de micronutrientes parecem estar associadas a um aumento do risco, ao passo que uma dieta rica em vegetais, particularmente rica em carotenos, e fruta diminui esse risco (LaVecchia et al., 1997). Existem evidências epidemiológicas que demonstram que a dieta modula o risco, progressão e prognóstico dos câncros da cabeça e pescoço (Lucenteforte et al., 2009, Sandoval et al., 2009, Colacino et al., 2012). Uma deficiência em vitamina A, cuja função reside em efeitos protetivos contra o desenvolvimento de cancro das células epiteliais, parece estar também associada a um possível desenvolvimento de cancro da cabeça e pescoço (de Vries et al., 1991). Apesar dos mecanismos moleculares através dos quais os componentes da dieta exercem os seus efeitos não estarem completamente compreendidos, a desregulação epigenética é um mecanismo chave na formação de tumores, que pode ser influenciada pela dieta. A metilação aberrante do DNA no cancro é tipicamente caracterizada pela hipermetilação específica do gene promotor, levando ao silenciamento genético e hipometilação das regiões intergênicas, que por sua vez leva à instabilidade genómica (McKay and Mathers, 2011, Colacino et al., 2012). A desregulação epigenética, tal como o silenciamento de genes supressores tumorais através da hipermetilação do promotor, é o maior evento nas doenças malignas. Assim, a ingestão de vitamina A, bem como de vitamina B12 e folatos, pode estar associada com o perfil de metilação do DNA do tumor nos HNSCC e melhorar a supressão tumoral (Colacino et al., 2012).

Tem sido demonstrado que existe um risco crescente associado a certos alimentos consumidos em zonas de elevado risco, incluindo peixe salgado e alguns alimentos preservados e condimentos picantes, uma vez que todos eles contêm grandes quantidades de compostos nitrosos e nitrosaminas voláteis. Estes compostos têm uma ação local sobre as células da orofaringe, incluindo alterações neoplásicas (Jemal et al., 2011).

Adicionalmente, o fator hereditariedade parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de HNSCC, pois existem evidências que sugerem que pode haver uma predisposição genética aumentada em 2 a 14 vezes para o desenvolvimento de HNSCC em indivíduos com parentes de primeiro grau com esta patologia (Ho et al., 2007).

Os agentes infecciosos, principalmente os vírus, podem estar associados ao desenvolvimento de diversas neoplasias uma vez que, para além de conseguirem escapar ao sistema imunitário do hospedeiro, produzem muitas vezes proteínas que controlam os mecanismos celulares, permitindo a sua replicação no interior das células. De entre a grande variedade de vírus existentes, alguns estão mais implicados no desenvolvimento de neoplasias, tais como o vírus do papiloma humano, o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da hepatite B e C, HHV-8, entre outros (Pagano et al., 2004).

3. VÍRUS E CANCRO

Em 1911, Rous descreveu pela primeira vez a capacidade de um “extrato livre de células”, induzir o desenvolvimento de tumores em galinhas (Maran et al., 1993), tendo sido posteriormente identificado o Vírus do Sarcoma de Rous (RSV) como agente carcinogénico (Rous, 1979). As investigações relativas a vírus envolvidos no desenvolvimento de tumores continuaram, e foram surgindo novas evidências da capacidade que alguns vírus tinham de induzir transformações malignas em animais, como o papiloma vírus de coelhos, descoberto por Peyton Rous e Joseph Beard em 1935, e o SV40 descoberto em 1960 por Ben Sweet e Maurice Hilleman em culturas de células de carcinomas renais de macacos. O primeiro vírus a ser associado ao desenvolvimento de cancro em humanos foi o Vírus de Epstein Barr (EBV), descrito em 1964 por Anthony Epstein, Bert Achong e Yvonne Barr, em linhas celulares derivadas do linfoma de Burkitt. Mais tarde, foram feitas novas descobertas: o vírus da leucemia das células T Humanas (HTLV1) foi associado à leucemia de células T (Poiesz et al., 1980); Palmer Beasley estabeleceu que o vírus da hepatite B (HBV) estava associado com o carcinoma hepatocelular (Beasley et al., 1981); o HPV foi associado ao cancro do colo do útero por Harald zur Hausen; Kiyosawa confirmou que o vírus da Hepatite C (HCV) era o fator de maior risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular; e mais recentemente o herpesvírus humano 8 (HHV8) foi associado com o sarcoma de Kaposi (Chang et al., 1994).

Devido à crescente associação entre vírus e o desenvolvimento de cancro, é importante distinguir os cancros associados a vírus e os cancros causados por vírus (Damania, 2007). Assim, torna-se necessário distinguir entre os vírus que atuam como iniciadores, co-carcinogénicos ou promotores do desenvolvimento tumoral (Pagano et al., 2004).

Numa doença multifatorial como o cancro, as modificações genéticas fazem parte das vias carcinogénicas. De facto, o cancro pode ser desenvolvido através de várias interações, em que as mutações e a desregulação genética são extremamente importantes, mas a alteração de um só gene não é suficiente para levar ao desenvolvimento de cancro (Michor et al., 2004). O desenvolvimento de cancro associado a vírus é dependente da interação de proteínas virais com as células hospedeiras, e muitos cientistas têm focado a sua investigação na disfuncionalidade das vias celulares que ocorrem numa neoplasia

associada a vírus (Vousden and Farrell, 1994, zur Hausen, 2001, Farrell, 2002). As proteínas das células hospedeiras são normalmente requeridas para a replicação viral e como os vírus persistem nas células, eles modulam a forma como a célula responde a estímulos variados. Além disso, a maioria dos vírus têm a capacidade de inibir as respostas imunes e de controlar o ciclo celular, dando origem a células proliferativas, que são a base do desenvolvimento do cancro. De modo semelhante, tem sido discutido que variações nas respostas imunes de cada indivíduo a infeções virais podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade dos diferentes indivíduos para o desenvolvimento de neoplasias (Kimura, 2006, Biron, 1998, Witkin et al., 2002).

3.1 Vírus do Papiloma Humano e o cancro

O vírus do Papiloma Humano é um pequeno vírus de DNA não encapsulado, envolto numa cápside proteica composta por duas proteínas, capaz de induzir proliferação de células epiteliais (Hebner and Laimins, 2006). O DNA circular de cadeia dupla do genoma destes vírus, codifica cerca de oito “open reading frames” (ORF’s) que são transcritos como mRNAs policistrónicos de uma cadeia de DNA (Figura 5). Atualmente os HPV’s dividem-se em quatro grupos com base na sua atividade oncogénica: elevado risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59), provável elevado risco (26, 53, 66, 68, 34, 73 e 82), baixo risco (6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e 89), e tipos de HPV de risco desconhecido (30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90, e 91) (de Villiers et al., 2004, Munoz et al., 2006, Nobre et al., 2008).

Os genomas dos HPV’s de alto risco apresentam dois promotores principais, em que o promotor inicial começa a transcrição a montante do ORF E6, enquanto o promotor final, que é dependente da diferenciação localizado no ORF E7, é ativado durante a fase latente do ciclo de vida do HPV, o que resulta numa transcrição de elevado grau das proteínas E1, E2, E4, E5, assim como das proteínas da cápside L1 e L2 (Klumpp and Laimins, 1999).

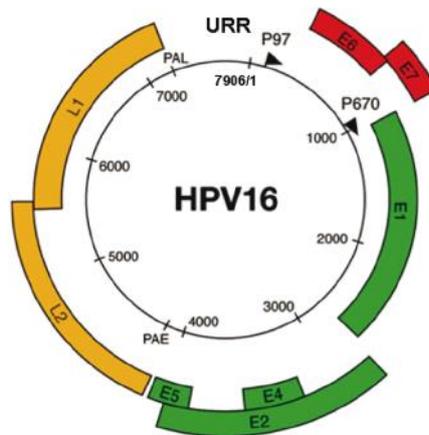


Figura 5: Estrutura genômica do DNA do HPV 16 (Xu et al., 2013).

3.1.1 Ciclo de vida do HPV

O resultado da infecção por HPV é variável consoante o tipo de células (camadas) onde ocorre a infecção. Se forem infetadas as estruturas superiores vai ocorrer infecção proliferativa, visto que estas células estão desprovidas de um núcleo completo, sendo rapidamente descamadas do epitélio (Durst et al., 1992, Stoler et al., 1992, Pett and Coleman, 2007). As primeiras células a serem infetadas pelos viriões de HPV são as da camada basal do epitélio, sendo reconhecidos na sequência da célula por um recetor indiferenciado (Bedell et al., 1991, Pett and Coleman, 2007). Quando a infecção ocorre nestas células, a expressão das oncoproteínas virais (que são mantidas por longos períodos no epitélio e portanto representam as células alvo dos eventos carcinogénicos) inibem a diferenciação e induzem uma elevada instabilidade cromossomal que pode levar à progressão para um fenótipo maligno (Munger et al., 2004, Pett and Coleman, 2007, Griep et al., 1993). Após entrada e integração do DNA viral no núcleo das células, o genoma viral mantém-se sob a forma episomal e o promotor inicial do HPV é ativado (Hebner and Laimins, 2006). Aqui, os oncogenes virais induzem re-entrada não programada na fase S do ciclo celular, com ativação da maquinaria de replicação do hospedeiro, necessária para a amplificação.

No início, a transcrição viral é regulada por elementos localizados numa região não codificada da ORF E6, denominada de região reguladora a montante (URR), que é responsável pela codificação das proteínas E6, E7, E1, e E2 (Hebner and Laimins, 2006). Durante esta fase da infecção pelo HPV, as proteínas virais impedem que as células saiam

do ciclo celular que ocorre nas células em diferenciação, no sentido de permitir que ocorra a produção de descendência viral (Stubenrauch and Laimins, 1999). Com a divisão das células basais, os episomas do HPV multiplicam-se e são distribuídos pelas células filhas. Uma das células filhas infectadas desloca-se para as camadas superiores do epitélio e começa a diferenciar-se, embora permaneça ativa no ciclo da célula. À medida que as células infectadas com HPV se diferenciam, o promotor final do HPV é ativado (Hebner and Laimins, 2006).

Nas camadas celulares superiores, o DNA viral é armazenado em cápsides que se formam de novo, e os viriões descendentes são libertados da célula. As proteínas da cápside (L1 e L2) são expressas nas células suprabasais altamente diferenciadas na fase final do ciclo de vida do HPV (Ozbun and Meyers, 1997). Depois da amplificação, os genomas do HPV são empacotados como cromatina nas cápsides virais compostas por L1 e L2, formando o virião que vai ser posteriormente sujeito a maturação, antes de ser libertado da célula (Figura 6) (Buck et al., 2005). As proteínas E6 e E7 são reguladas pela proteína E2 que, em situações normais, reprime a transcrição dos genes E6 e E7 (Canadas et al., 2010). Durante a infecção, os produtos virais das oncoproteínas E6 e E7 são importantes no processo de transformação e immortalização das células infectadas, causando o desenvolvimento de lesões malignas (Thorland et al., 2003)

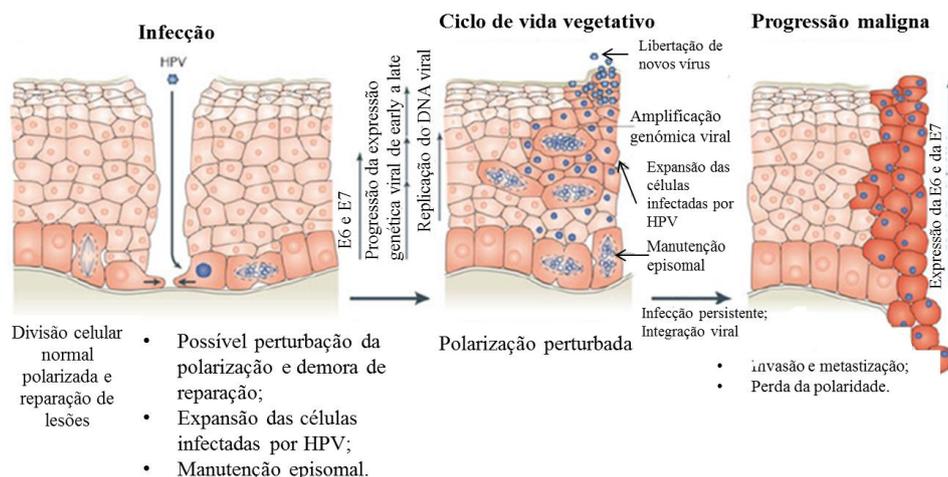


Figura 6: Organização do genoma do HPV e ciclo de vida do vírus (Banks et al., 2012).

3.1.2 Mecanismos de carcinogénese

O ponto principal no mecanismo de carcinogénese dos HPV's de alto risco é a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. Este processo de integração ocorre em locais aleatórios, mas no entanto, esta integração pode ocorrer com mais frequência em sítios frágeis comuns (CFS) de elevada instabilidade genómica. Os sítios frágeis são *loci* específicos no cromossoma que exibem lacunas ou quebras, em resposta a certos agentes químicos. A integração ocorre por linearização do genoma do HPV e consequente integração no genoma do hospedeiro, por ativação das vias de reparação do DNA. A integração deve então representar uma ocorrência casual que se torna mais provável por qualquer evento que aumente a frequência de quebras da cadeia dupla (DSBs) no DNA do hospedeiro e viral (Pett and Coleman, 2007). Existem vários estudos que indicam que a frequência com que ocorre a integração é aumentada pela indução de DSBs, quer pela E6 e E7 dos HR-HPV quer pela expressão dos sítios frágeis comuns (CFSs) (Yu et al., 2005, Matzner et al., 2003). A opening reading frame E2 (ORF E2) tem sido identificada como o sítio de preferência de integração do HPV, sendo quebrada ou eliminada mais frequentemente do que outros sítios (Canadas et al., 2010, Gallo et al., 2003). A proteína E2 contribui para o controlo do número de cópias e desempenha também um papel importante na manutenção episomal, podendo ligar os genomas virais aos cromossomas durante a divisão do ciclo celular através da interação com a proteína cromossomal celular Brd4. A integração do DNA viral apenas ocorre quando a região ORF E2 está danificada no genoma do vírus, sendo assim eliminado o controlo da transcrição, pelo E2, do promotor inicial e a sua perda resulta numa produção aumentada das oncoproteínas E6 e E7 (Hebner and Laimins, 2006). Assim, a falta de controlo da E2 sobre a transcrição dos genes E6 e E7, como consequência da integração tem um papel importante na progressão e desenvolvimento de lesões malignas (Canadas et al., 2010). Estes acontecimentos são restritos aos HPV de alto risco, fornecendo uma explicação biológica para a diferença no risco de cancro associado aos HPV de alto e baixo risco (Pett and Coleman, 2007). Desta forma, a integração dos HPV de alto risco é fundamental para a imortalização, proliferação desregulada e aumento da instabilidade genómica, características celulares que contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo maligno (Hanahan and Weinberg, 2011).

A proteína E6 do HPV está localizada quer no núcleo quer no citoplasma dos queratinócitos infetados, e a sua função melhor caracterizada é a sua capacidade de

interferir com a regulação do ciclo celular através da interação com a p53 (Hebner and Laimins, 2006). É uma oncoproteína viral que coopera com a ubiquitina ligase E6-AP para se ligar à p53 levando à sua degradação através da proteólise dependente da ubiquitina (Figura 7) (Scheffner et al., 1990, Sousa et al., 2007). A proteína supressora tumoral p53 tem três funções fundamentais (paragem do ciclo celular, ativação da reparação do DNA e regulação da apoptose) atuando como “o guardião do genoma”, e quando as células têm danos graves ou irreparáveis no DNA, ativa a paragem do ciclo celular e induz reparação do DNA ou apoptose, evitando que as células progridam no ciclo celular com mutações genéticas (Sousa et al., 2007, Vogelstein and Kinzler, 1992). A degradação desta proteína resulta numa redução dos seus níveis, diminuindo assim as restrições do ciclo celular do DNA e permitindo que as células continuem a proliferar. A inativação funcional da p53 pela E6-HPV atua de forma semelhante a qualquer mutação na *TP53* que pode afetar as funções normais da p53, o que de facto explica a importância do HPV na regulação do ciclo celular e na progressão maligna (Sousa et al., 2007).

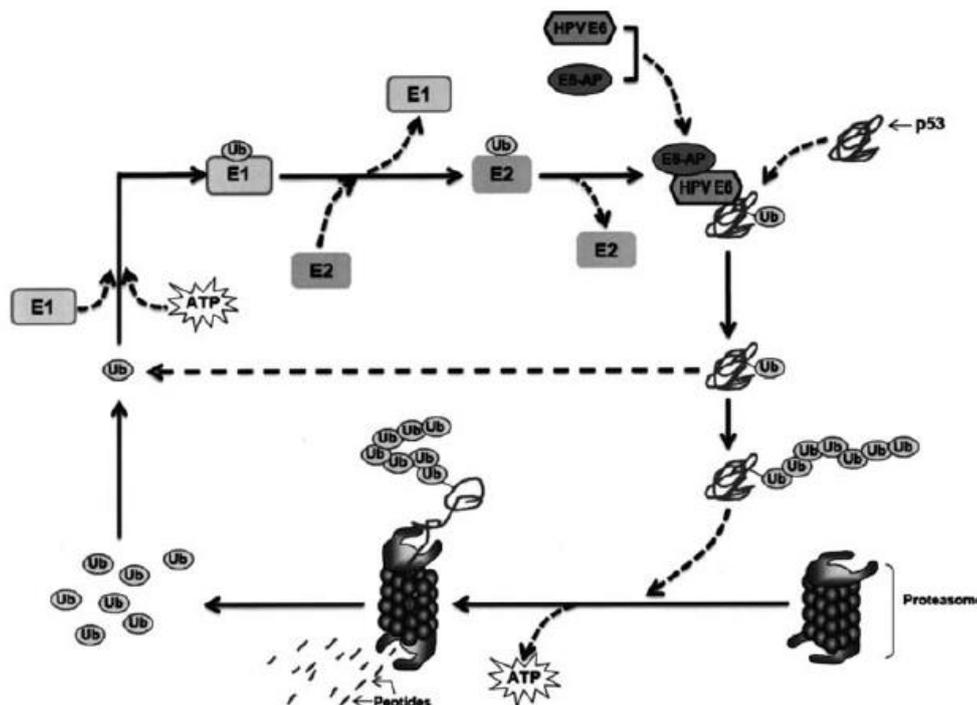


Figura 7: Degradação da p53 mediada pela via do proteossoma-ubiquitina. A ubiquitina (Ub) é uma proteína com 76 aminoácidos, altamente conservada nos eucarióticos e está envolvida na proteólise e em muitos outros processos. A ubiquitina livre é primeiramente ativada por uma ligação covalente à enzima E1, numa reação dependente de ATP, sendo posteriormente transferida para uma enzima de conjugação da ubiquitina (E2). Por fim, a E6 liga-se ao complexo E6-AP, que se liga então à p53. A p53 poli-ubiquitinada é reconhecida e degradada pelo proteossoma, e a ubiquitina é regenerada (Sousa et al., 2007). *Foi pedida autorização ao autor para inclusão nesta tese.

Uma outra função importante da proteína E6 é a sua capacidade de aumentar o tamanho dos telómeros nas células epiteliais, pela ativação da subunidade catalítica da enzima telomerase (hTERT), uma enzima importante para a manutenção das estruturas teloméricas na extremidade dos cromossomas (Stoppler et al., 1997). A atividade da telomerase é detetada em mais de 90% das células imortalizadas e cancerígenas, mas está ausente na maioria das células somáticas normais (Kim et al., 1994), sugerindo que a ativação da telomerase é um evento importante durante o processo de imortalização e transformação maligna (Veldman et al., 2001). A ausência da atividade da telomerase em células normais resulta na perda progressiva dos telómeros em cada ciclo celular devido à finalização incompleta da replicação do DNA linear (Harley et al., 1990), que leva à instabilidade cromossômica e à senescência celular. Deste modo pensa-se que a diminuição dos telómeros representa um “relógio mitótico” que determina o tempo de vida de uma célula normal. A atividade da telomerase está intimamente relacionada com a expressão da sua subunidade catalítica, hTERT (Veldman et al., 2001). Existem estudos que mostraram que a atividade da telomerase pode ser induzida nos queratinócitos humanos pela expressão da oncoproteína E6 do HPV (Klingelutz et al., 1996, Veldman et al., 2001). A E6 é capaz de transativar o promotor hTERT, indicando que o mecanismo de aumento da expressão da hTERT mediado por esta oncoproteína, ocorre predominantemente ao nível da regulação da transcrição, embora seja possível que outros mecanismos, como a estabilidade do RNA ou processamento, podem fornecer o seu contributo na ativação da telomerase (Veldman et al., 2001).

De todas as proteínas *early* do HPV, a E7 parece ser aquela que é mais eficiente na desregulação do ciclo celular (Ghittoni et al., 2010). Com base na estrutura primária esta proteína viral, que pode ser dividida em três domínios (as regiões conservadas 1-3, CR1-3, CR2), contém um domínio LXCXE envolvido na ligação à proteína do retinoblastoma (pRb1) e as suas relacionadas p107 e p130. Estas três proteínas estão profundamente envolvidas na regulação do ciclo celular. A pRb1 atua como supressor tumoral, regulando negativamente a atividade de diversos fatores de transcrição, incluindo os membros da família E2F (Cobrinik, 2005, Dimova and Dyson, 2005) (Figura 8). Em condições normais de regulação do ciclo celular, a fosforilação da pRb, que é mediada pela atividade da cinase dependente de ciclina (CDK), leva à disrupção do complexo pRb/E2F, com consequente ativação do E2F. A E7 liga-se às proteínas p107 e p130 o que, de forma

análoga à fosforilação mediada pela CDK, resulta na libertação dos fatores ativos E2F1 ao 3, que por sua vez ativa a transcrição de um grupo de genes que codificam proteínas essenciais na progressão do ciclo celular (Figura 8), contribuindo assim para uma proliferação celular descontrolada (Ghittoni et al., 2010).

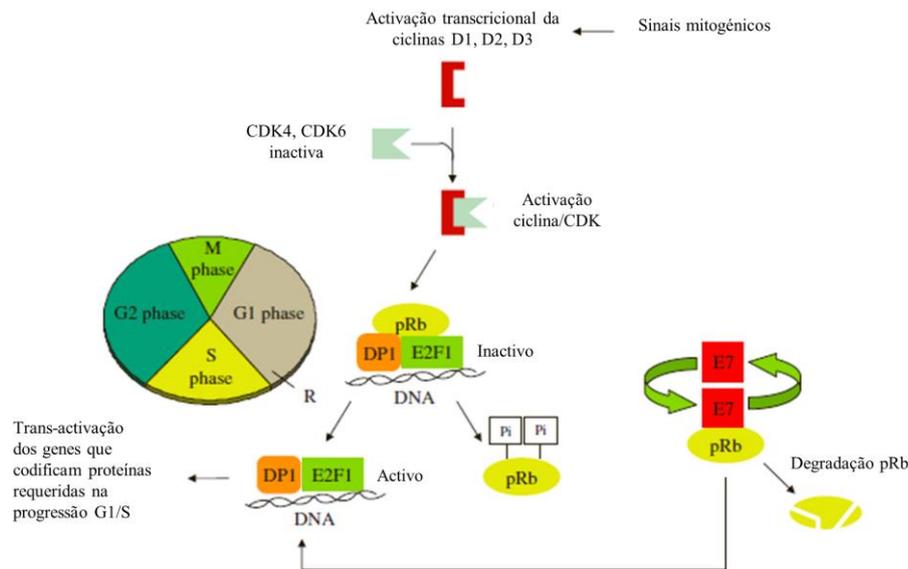


Figura 8: Desregulação do ponto de restrição (R) do ciclo celular pela E7. Os fatores de transcrição E2F formam dímeros com a família DP e regulam a transcrição de diversos genes durante o ciclo celular. Nas células quiescentes, a pRb está presente na sua forma hipofosforilada e associa-se com moléculas E2F, inibindo assim a sua atividade transcripcional. Quando as células quiescentes são expostas a sinis mitogénicos, são ativados genes que codificam as ciclinas D, específicas da fase G1 (D1, D2 e D3). Consequentemente, as ciclinas associam-se com uma subunidade catalítica, CDK4 ou 6, e após o transporte para o núcleo o complexo cinase fosforila a pRb no meio da fase G1, causando libertação do complexo ativo E2F/DP1 e progressão através do ponto de restrição (R). A ligação da E7 à pRb imita a sua fosforilação. Assim, as células que expressam a E7 conseguem prosseguir para a fase S na ausência de sinis mitogénicos (Adaptado de Ghittoni, 2010).

3.1.3 HPV e cancro cabeça – pescoço

Apesar da infecção por HPV não estar sempre envolvida nos câncros de cabeça pescoço, existem evidências de que, pelo menos um subconjunto de câncros orais sejam positivos para o HPV, sendo 90% dos positivos causados pelo HPV 16 (Psyrrri and DiMaio, 2008).

O HPV, juntamente com os componentes do fumo do tabaco e o abuso do álcool são fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores, tendo sido detetado em cerca de 20% de todos os carcinomas das células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCCs) (Schwartz et al., 1998b). O HPV pode ter desenvolvido inúmeros mecanismos para escapar ao sistema imunitário, mas a natureza transiente da infecção confere pouco crédito à sua capacidade de provocar mudanças neoplásicas na ausência de outros fatores carcinogénicos (Smith et al., 2010). Por exemplo, os componentes do fumo do tabaco causam alterações celulares e estruturais que podem comprometer a capacidade das células recuperarem de danos mutagénicos, e tendem a facilitar a infecção pelo HPV. Também se sabe que estes componentes suprimem os mediadores do sistema imunitário, facilitando assim a persistência da infecção pelo HPV, um passo fundamental no desenvolvimento de cancro relacionado com HPV (Sinha et al., 2012).

O processo de integração do vírus no genoma do hospedeiro ocorre em sítios frágeis ou “hot spots” de quebra do DNA, e existem estudos que demonstram que o fumo do tabaco induz quebras no DNA nas células humanas (Luo et al., 2004). Assim, um aumento da frequência de integração do HPV nos fumadores pode aumentar o risco de carcinogénese na presença de infecção por HPV (Sinha et al., 2012).

Tal como no caso do cancro do colo do útero, a patologia mais associada com o HPV, os HPV positivos são carcinomas do tipo epidermóide menos propensos a expressarem pRb e p53 e mais propensos a expressarem a p16 (Psyrrri and DiMaio, 2008).

Existem dados publicados que demonstram que a sero-reatividade à cápside viral do HPV16 no soro armazenado cerca de dez anos antes do diagnóstico de HNSCC aumenta cerca de catorze vezes o risco de incidência de carcinoma da orofaringe. Estes dados fornecem uma forte evidência para uma relação temporal entre a exposição ao HPV e o desenvolvimento de HNSCC (Mork et al., 2001).

Em estudos efetuados, os HNSCC induzidos pelo HPV estão associados a um melhor prognóstico do que os câncros negativos para o HPV (Licitra et al., 2006b). Apesar dos

mecanismos exatos não estarem completamente entendidos, pensa-se que o genoma das células infetadas com HPV será menos estável e desta forma mais suscetíveis a danos com a radioterapia e conseqüentemente maior será a taxa de apoptose, e/ou nos doentes com HNSCC que são tratados com certos medicamentos, como o nimorazol, as células sofrem modificações por hipoxia, sendo mais facilmente induzidas para apoptose, melhorando o prognóstico dos doentes que são HPV positivos (Lassen et al., 2010, Lajer and von Buchwald, 2010); ou o facto de, ao contrário do que acontece nos HNSCC associados ao tabaco, a presença do gene *TP53* funcional nos HPV positivos pode tornar o tumor suscetível a apoptose induzida pela radiação (Syrjanen, 2010).

3.2 Vírus Epstein-Barr (EBV) e o cancro

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um herpes-vírus humano com um genoma de DNA de cadeia dupla, com 180 000 pares de bases capaz de codificar mais de 85 genes (Thompson and Kurzrock, 2004b). O genoma viral apresenta-se de forma linear no entanto, dentro das células, o DNA viral encontra-se sob a forma episomal, assumindo uma regulação complexa pela enorme quantidade de proteínas/transcritos que são expressas. A identificação do EBV foi feita em 1964 a partir de biópsias de Linfoma de Burkitt Africano, contudo é um vírus que está associado a varias patologias, desde a mononucleose infecciosa até neoplasias de vários tipos (linfoma de Burkitt, carcinoma da nasofaringe e doença de Hodgkin (Javier and Butel, 2008) (Figura 9).

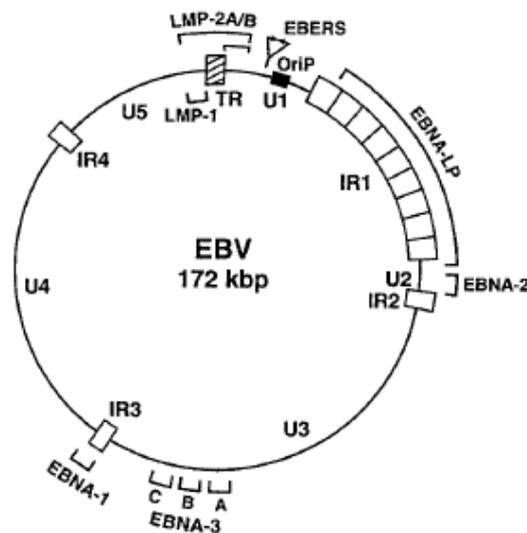


Figura 9: Mapa genómico do EBV (Pagano et al., 2004).

3.2.1. Ciclo de vida

Tal como outros herpesvírus humanos, o EBV é ubíquo com uma larga distribuição mundial, infectando a maioria da população adulta. A infeção primária pelo EBV ocorre normalmente durante os primeiros anos de vida e a maior parte das vezes é assintomático, contudo, depois da infeção primária, o indivíduo permanece um portador vitalício do vírus (Kuppers, 2003).

O EBV permanece num estado latente nos linfócitos B dos indivíduos infectados por longos períodos de tempo, no entanto, ocasionalmente, pode ocorrer reativação, permitindo

a infecção de novas células que podem, ou não, ser transformadas levando ao desenvolvimento de células neoplásicas. Estes eventos ocorrem frequentemente na presença de condições de imunossupressão do hospedeiro, que estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de uma infecção transformante (Sousa et al., 2011). A manutenção do genoma viral no núcleo das células é crucial para a latência do EBV, estabelecendo a expressão de várias proteínas de latência (LMP1, LMP2A, LMP2B, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C e EBNA3-LP) que interagem com proteínas chave do ciclo celular e da apoptose, favorecendo o estabelecimento de um fenótipo proliferativo, que leva ao desenvolvimento de cancro (Saha et al., 2009).

Depois de induzir uma infecção, o EBV estabelece três fases de latência. Especialmente nos linfomas de Burkitt, a fase de latência I é expressa permitindo apenas a síntese do antígeno nuclear EBV (EBNA-1), transcritos agrupados em volta de uma open frame (BARF-0) e de pequenos RNAs não traduzidos (EBERs). A fase de latência II da infecção do EBV é caracterizada pela expansão do perfil da fase I e da expressam de proteínas de membrana de latência (LMP) 1 e 2; A fase de latência III é expressa principalmente nos tumores linfoblásticos induzidos pelo EBV, sendo que neste caso a regulação genética ocorre a partir de um promotor diferente e resulta na expressão de seis proteínas EBNA, três LMPs e dos EBERs (zur Hausen, 1999).

3.2.2 Mecanismos de carcinogénese

Para ser oncogénico o EBV tem de manter o seu genoma viral na célula, evitar a eliminação pelos mecanismos celulares, e prevenir a célula de se tornar o alvo de destruição pelo sistema imunitário. Para manter o DNA viral na célula, o EBV estabelece a infecção latente nos linfócitos B, onde persiste quer como múltiplas cópias de episomas circulares ou integrando o DNA viral no genoma do hospedeiro. Assim, o vírus assegura a sua transmissão para as células descendentes quando os linfócitos B se replicam (Thompson and Kurzrock, 2004a).

Uma propriedade chave do EBV, que explica a sua clara ligação ao cancro, é a sua capacidade de alterar a regulação da proliferação das células B e induzir uma transformação de crescimento permanente (Figura 10). Esta capacidade é claramente

demonstrada pela linfo-proliferação de células B em pacientes que estão imuno-comprometidos.

O EBV codifica múltiplas proteínas virais que têm efeitos profundos na expressão celular (Pagano et al., 2004) e que interagem ou exibem homologia com uma variedade de moléculas anti-apoptóticas, citocinas e transdutores de sinal, promovendo a infecção do EBV, imortalização e transformação (Thompson and Kurzrock, 2004a). Vários oncogenes capazes de induzir a formação de tumores, são induzidos pela infecção latente do EBV (bcl-2, bcl-10, c-fgr), e algumas das proteínas virais possuem propriedades oncogênicas por si só (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C, LMP1) (Goldenberg et al., 2001). Durante uma infecção latente, o EBNA-3A, EBNA-3B, e EBNA-3C provocam respostas específicas dos linfócitos T citotóxicos, que parecem ser as respostas de latência dominantes às proteínas do EBV (Murray et al., 1992).

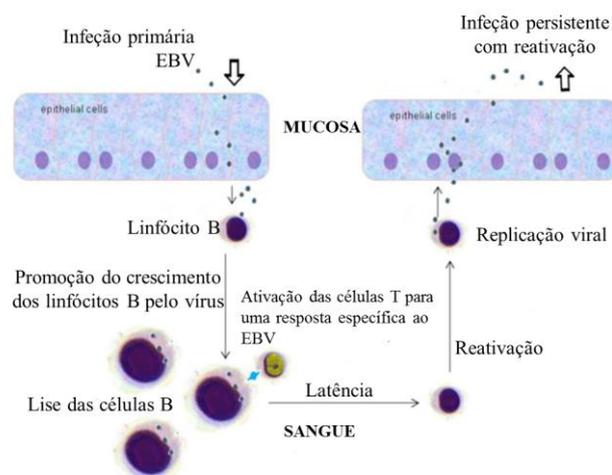


Figura 10: Esquema representativo da infecção primária e persistente do EBV (Grinde, 2013).

A proteína nuclear EBNA-2 é a primeira proteína latente detetada depois da infecção pelo EBV (Thompson and Kurzrock, 2004a). É um co-ativador de transcrição que coordena a expressão genética viral no estado de latência III e a de muitos genes celulares, desempenhando por isso um papel crítico na imortalização celular (Wensing and Farrell, 2000, Thompson and Kurzrock, 2004a). A proteína EBNA-LP é também uma das primeiras proteínas virais produzidas durante a infecção pelo EBV das células B, que interage com o EBNA-2 para conduzir os linfócitos B em repouso para a fase G1 do ciclo celular (Sinclair et al., 1994), através da ligação e inativação da p53 e da pRb (Szekely et al., 1993).

O gene LMP-2 codifica duas proteínas integrais de membrana, que diferem nos seus domínios terminais (Thompson and Kurzrock, 2004a). Esta proteína sequestra as tirosinas cinases e inibe a translocação do recetor das células B na membrana plasmática. Esta transposição bloqueia a ativação das células B e previne assim a ativação do ciclo de replicação viral. Nas células epiteliais, a LMP2 inibe a diferenciação e induz a proliferação celular através da ativação da PI3K e da AKT. Este bloqueio da diferenciação das células epiteliais pode inibir a ativação da replicação do EBV (Pagano et al., 2004).

3.2.3 EBV e o cancro da nasofaringe

O cancro da nasofaringe é um dos tipos de cancro da faringe que, apesar de raro, tem importante relevância pela sua associação com a infeção pelo EBV. O carcinoma da nasofaringe é classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em três diferentes tipos, de acordo com as suas características: carcinoma das células escamosas (SCC) (WHO tipo 1); carcinomas não queratinizados (WHO tipo 2); e carcinomas indiferenciados ou linfoepiteliomas (WHO tipo 3) (Goldenberg et al., 2001). Os carcinomas indiferenciados ou linfoepiteliomas são os mais frequentes associados ao EBV.

No carcinoma da nasofaringe o EBV infeta as células epiteliais da nasofaringe posterior na fossa de Rosenmuler do anel Waldeyer (Pagano et al., 2004). Existem dois modelos explicativos dos mecanismos de entrada do EBV nestas células: 1) através de uma proteína de superfície que é antigenicamente relacionada com as células B, o recetor CD21, e que pode ser usado como cartão de entrada para o EBV (Young et al., 1989); ou 2) através de uma endocitose mediada pela IgA (Lin et al., 1997) (Figura 11).

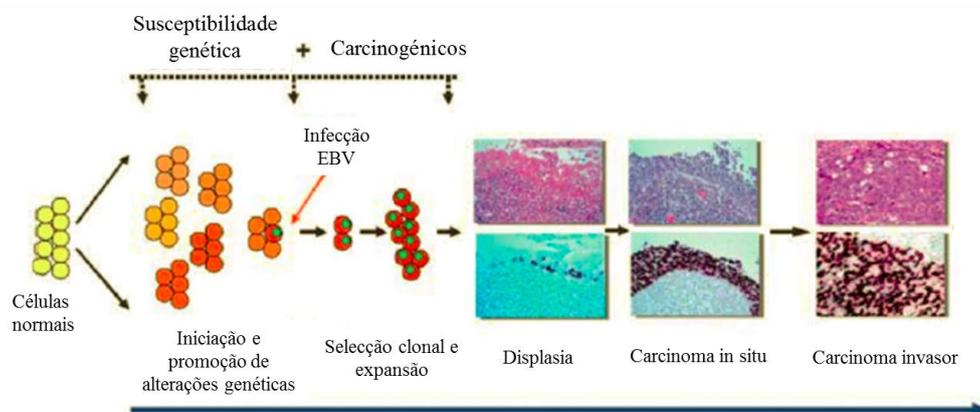


Figura 11: Carcinogênese do carcinoma da nasofaringe (Adaptado de (Lo et al., 2004).

Tal como acontece no caso do carcinoma das células escamosas de cabeça e pescoço, o carcinoma da nasofaringe é uma patologia com causa multifatorial, para a qual contribuem também outros fatores para além do EBV, tal como numerosos fatores ambientais, em particular: a exposição ao fumo do tabaco, o consumo de peixes salgados e alimentos que contêm nitrosaminas ou precursores das mesmas numa idade precoce, e a exposição ocupacional a pó da madeira (Catarino et al., 2006).

Neste caso, pensa-se que o EBV infeta as células B e epiteliais da nasofaringe precocemente (durante a infância e adolescência), sendo posteriormente reativada a sua replicação e ativada a capacidade de transformação na presença de outros fatores de risco. A infeção pelo EBV é o evento crucial para o desenvolvimento do carcinoma indiferenciado da nasofaringe, dada a sua capacidade de induzir proliferação celular das células epiteliais e linfócitos B (Murray and Young, 2001). Isto acontece provavelmente como resultado de uma reativação do vírus em combinação com outros eventos, tais como lesões genéticas celulares causadas por carcinogénicos ambientais e/ou alguns defeitos imunes.

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são caracterizar a prevalência da infecção pelo Vírus Epstein-Barr (EBV) e Vírus do Papiloma Humano nos tumores de cabeça e pescoço; comparar a prevalência viral nas diferentes amostras (saliva e tecido); e avaliar a presença de DNA viral na saliva como possível biomarcador preditivo do cancro de cabeça e pescoço.

II. DESENHO DO ESTUDO

1. TIPO DE ESTUDO

Estudo prospetivo de base hospitalar.

POPULAÇÃO

Neste estudo foram incluídos todos os doentes consecutivos com diagnóstico de carcinoma de cabeça e pescoço (n=82), atendidos no Serviço de Otorrinolaringologia do IPO Porto FG EPE, entre março e setembro de 2013. O grupo de doentes foi constituído por 7 indivíduos do género feminino e 75 do género masculino, com idade média de 54,8 ($\pm 10,8$) anos e mediana de 55 (34-87) anos (Figura 12). Todos os casos foram observados por médicos especialistas em otorrinolaringologia e o diagnóstico confirmado por histologia avaliada por um patologista da instituição.

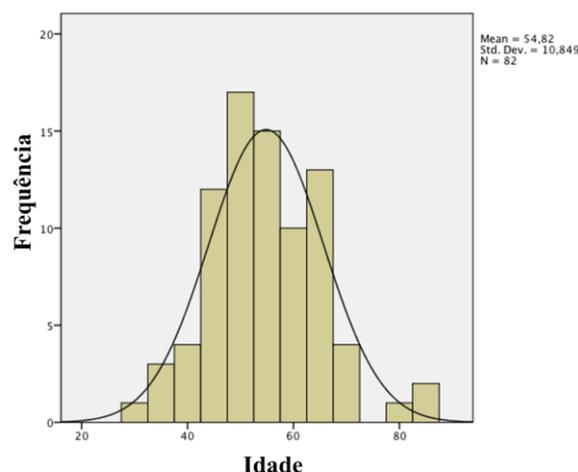


Figura 12: Gráfico ilustrativo da distribuição das idades.

Foram incluídos no estudo os doentes com: carcinoma da cavidade oral, que inclui lábios, língua, pavimento da boca, mucosa bucal, palato mole e trígono retromolar; carcinoma da faringe, que inclui orofaringe (amígdalas, base da língua, palato mole) e hipofaringe (seios piriformes); carcinoma da laringe, que inclui cordas vocais, subglote, supraglote e glote; e carcinoma da nasofaringe. Foram excluídos do estudo doentes com diagnóstico prévio de cancro de cabeça e pescoço (recidiva); e/ou doentes que tenham iniciado ciclos de tratamento (quimioterapia/radioterapia).

2. AMOSTRA

Foram recolhidas amostras de saliva e cortes histológicos de biopsias/tecido incluídos em parafina. A saliva foi recolhida na primeira consulta dos doentes e a biopsia/tecido após cirurgia/biopsia diagnóstica.

3. QUESTÕES ÉTICAS

Este estudo não interferiu com os procedimentos de rotina decididos pelos clínicos. Todos os procedimentos foram aprovados pela *Comissão de Ética para a Saúde* do IPO Porto FG EPE (Ref CES 161/2013) e todas as amostras foram obtidas com o consentimento informado dos participantes. Os dados clinicopatológicos foram recolhidos dos registos clínicos individuais e inseridos numa base de dados com codificação única.

III. METODOLOGIA

1. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

1.1. Saliva

A recolha de saliva foi efetuada para um frasco estéril de 50 mL, sem estimulação e com um período de jejum mínimo de 2 horas. Foram aliqüotados 400 µL para extração de ácidos nucleicos e o restante foi armazenado com uma solução de ureia 6M a -80°C.

Inicialmente, as amostras de saliva foram tratadas com 300 µL de *Magna Pure lysis Buffer* (Roche, Indianapolis, USA). Num tubo de micro-centrífuga de 1.5 mL adicionou-se 200 µL de amostra, 300 µL de *Magna Pure Lysis Buffer* e 20 µL de proteinase K. A mistura foi incubada a 65°C, durante cerca de 30 minutos. Após a incubação, o DNA viral foi extraído das amostras usando o *kit High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche ®, Indianapolis, USA).

1.2. Tecidos incluídos em parafina

Foram obtidas lâminas com tecidos incluídos em parafina (cortes de 10µm) para extração de ácidos nucleicos. Inicialmente fez-se um processo de desparafinação das amostras, que depois de retiradas das lâminas foram colocadas num tubo de micro-centrífuga de 1.5 mL com 1 mL de xileno. Misturou-se vigorosamente no vórtex durante 10 segundos, centrifugou-se a 13000 g durante 2 minutos à temperatura ambiente e removeu-se o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 100% para remover o xileno. Centrifugou-se o tubo a 13000 g durante 2 minutos à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante, e deixou-se o evaporar todo o etanol a 37°C. De seguida para extração de DNA foi utilizado o *kit QIAamp DNA FFPE Tissue* (QIAGEN®, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

1.3. Avaliação da qualidade da extração de ácidos nucleicos

O DNA genómico total foi quantificado e a sua pureza e integridade analisados usando o Espectrofotómetro NanoDrop® v3.7 (Thermo Scientific, Wilmington DE, USA).

A presença de DNA genómico amplificável foi testada com um protocolo de PCR para a amplificação do gene da Ciclina (Tabela 6, anexo 1). A reação de PCR foi realizada numa solução de 50 µL com 1 x tampão Taq, 1.5 mM MgCL₂, 0.2 mM dNTP's, 0.20 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 0.2 µg de DNA genómico. As condições de

amplificação foram as seguintes: desnaturação do DNA a 95 °C durante 7 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, e 72 °C durante 1 min, e um passo final de extensão a 72 °C durante 10 min. O fragmento amplificado de 167 pares de bases (bp) foi analisado por eletroforese num gel de agarose 1.5% (w/v) corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

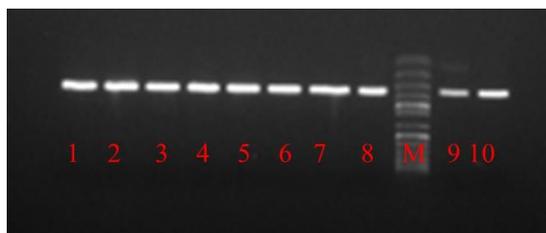


Figura 13: 1-8: amostras de saliva; M-Marcador 50pb; 9 e 10 - amostra com DNA genómico (Controlo positivo). O produto de PCR com 167 pares de bases indica a presença de produto de amplificação de um fragmento do gene da Ciclina D1.

2. DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HPV

2.1 Protocolo MY09/11

O DNA do HPV foi amplificado pela técnica do PCR, usando os primers degenerados MY09/11 (Tabela 6, anexo1), que amplificam uma região de 449-458 bp dependendo do tipo de HPV. Estes primers amplificam uma região altamente conservada do gene L1 do HPV e são potencialmente capazes de detetar um grande número de tipos de HPV da mucosa numa só reação de PCR (Nobre et al., 2008). A amplificação foi realizado numa mistura de reação de 50 µL com 1 x tampão de PCR, 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 0.2 µ de DNA. As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 45s, 55 °C durante 45s, e 72 °C durante 1 min, e um passo final de extensão a 72 °C durante 5 min. O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.5% (w/v) corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.



Figura 14: 1-10: amostras de saliva; M-Marcador 100pb; 11-controlo positivo. O produto de PCR com 449-458 pares de bases indica a presença de produto de amplificação de um fragmento do gene L1 do HPV.

2.2 Protocolo GP5+/6+

Como protocolo alternativo ao MY09/11 foi utilizado um protocolo usando os primers GP5+/6+ (Tabela 6, anexo1) que permite a amplificação de uma região de 150 bp altamente conservada do gene L1 do HPV e potencialmente capazes de detetar um grande número de tipos de HPV da mucosa numa só reação de PCR. A amplificação foi realizada numa mistura de reação de 50 µL com 1x tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 0.2 µg de DNA. O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.5% (w/v) corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.



Figura 15: 1-10: amostras de saliva; M-Marcador 100pb; 11-controlo positivo. O produto de PCR com 150 pares de bases indica a presença de produto de amplificação de um fragmento do gene L1 do HPV.

2.3 Protocolo HPV 16 e 18

Para confirmar a presença de HPV16/18 foi desenvolvido um protocolo de multiplex PCR, usando os primers HPV16 E6F/6R e HPV18 F/R (Tabela 6, anexo1), que amplificam uma região de 130 bp e 100 bp do HPV16 e HPV18, respetivamente. A amplificação foi realizada numa mistura de reação de 50 µL com 1 x tampão de PCR, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 0.2 µg de DNA. As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C durante 45s, 58 °C durante 45s, e 72 °C durante 45s, e um passo final de extensão a 72 °C durante 7 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% (w/v) corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

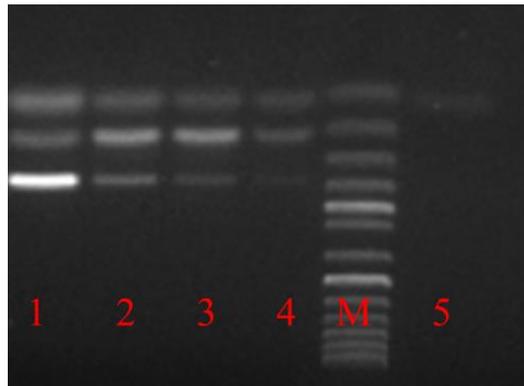


Figura 16: 1-4: Amostras positivas para HPV 16 e HPV 18; M-Marcador 50 bp; 5-Controlo negativo. O produto de PCR com 130 e 100 pares de bases indica a presença de produto de amplificação de um fragmento do DNA do HPV16 e 18, respetivamente.

2.4 Protocolo do HPV 6 e 11

Para confirmar a presença de HPV6/11 foi desenvolvido um protocolo de multiplex PCR, usando os primers 11F/11R e 6F/6R (Tabela 6, anexo1), que amplificam uma região de 360 bp e 280 bp do HPV11 e HPV6, respetivamente, correspondentes à amplificação de um fragmento do gene L1. A amplificação foi realizada numa mistura de reação de 50 μ L com 1 x tampão de PCR, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 0.2 μ de DNA. As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 7 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, e 72 °C durante 31 min, e um passo final de extensão a 72 °C durante 10 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% (w/v) corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

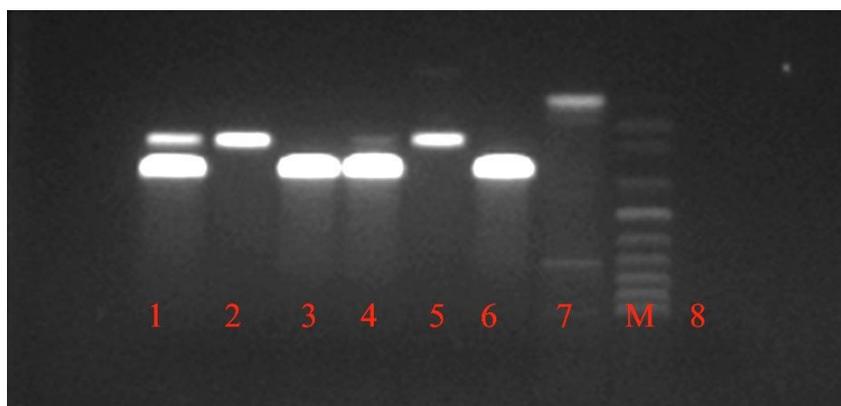


Figura 17: 1 e 4controllo positivo para HPV 6 e 11; 2 e 5: controlos positivos para HPV 6; 3 e 6: controlos positivos para HPV 11; 7-amostas de saliva negativa para HPV 6 e 11; M-Marcador 100 bp; 8-Controlo negativo. O produto de PCR com 360 e 280 pares de bases indica a presença de produto de amplificação de um fragmento do DNA do HPV6 e 11, respetivamente.

2.5 Genotipagem

Os casos positivos para HPV, com os primers MY09/11, foram genotipados por análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), como descrito por Nobre et al. 2008. Cada reação de endonuclease de restrição foi realizada numa reação de volume final de 20 μ L, usando 5 μ L de produto de PCR MY09/11, 2 μ L de 10 x de tampão de restrição recomendado, e 10 unidades de cada endonuclease de restrição: PstI (New England BioLabs, R0140S), HaeIII (Fermentas Inc., #ER0151, Canada), DdeI (New England BioLabs, R0175L) e RsaI (New England BioLabs, R0167S).

A digestão foi realizada a 37 °C durante 6 horas e os fragmentos de restrição separados por eletroforese. A identificação dos tipos de HPV foi executada usando o algoritmo proposto por Nobre *et al* (Nobre et al., 2008).

3. DETEÇÃO DO EBV

A detecção de EBV foi realizada por PCR em tempo real, como descrito por Marinho-Dias (Marinho-Dias et al., 2013) utilizando os primers EBV POL F/R e respectiva sonda do tipo TaqMan (Tabela 6, anexo1). O produto de PCR é detetado por um aumento de fluorescência usando o sistema Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, California).

A amplificação foi realizada usando a *TaqMan Universal PCR master mix* (Applied Biosystems, Foster City, California). A reação foi realizada numa mistura de 25 µL contendo: 5 µL de DNA template, 2 µM de cada primer EBV POL e 5 µM de sonda TaqMan. A reação é feita numa microplaca sob as seguintes condições: 50 °C durante 2 min; 95 °C durante 10 min; e 50 ciclos a 95 °C durante 15 s; e 60 °C durante 1 min. A leitura da fluorescência da sonda é efetuada durante o passo de annealing/extensão a 60°C. A detecção de amostras positivas é feita por observação de uma curva de amplificação do sinal da fluorescência da respectiva sonda.

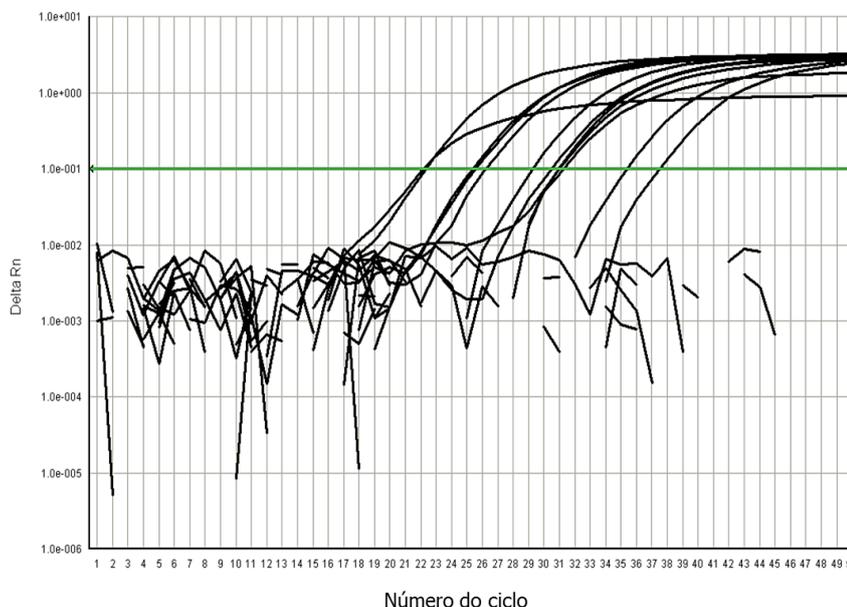


Figura 18: Imagem representativa da amplificação/deteção de EBV por PCR em tempo real, com demonstração das curvas de amplificação das amostras.

4. CONTROLO DE QUALIDADE

A deteção viral foi realizada sem discriminação de casos e analisados independentemente por dois autores. Foram selecionados aleatoriamente 10 por cento de todas as amostras, e submetidas novamente a uma amplificação para confirmar os resultados.

Em todas as reações foram utilizados um controlo positivo e um controlo negativo de amplificação. Os controlos positivos utilizados foram amostras positivas do controlo de Qualidade Externo do Serviço de Virologia do IPO Porto, e como controlo negativo foi utilizada água bidestilada em substituição da amostra.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* de computador *SPSS (Statistical Package for Social Sciences* versão 20.0) para Mac. O Teste do Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar as variáveis categóricas, com um nível de significância de 5%. O Teste de Fisher foi usado para tabelas que continham células cujos valores eram inferiores a 5 indivíduos.

IV RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram obtidas amostras de 82 doentes com patologias da cavidade oral, faringe e laringe. Onze doentes foram excluídos do estudo por não respeitarem os critérios de inclusão relativamente ao tipo de patologia, sendo que dois eram metástases de carcinoma primário oculto, um linfoma não Hodgkin, duas papilomatoses, um pólip, um melanoma das mucosas, uma úlcera e três casos foram excluídos por não ser possível obter qualquer tipo de informação relativamente ao tipo de patologia.

Foram então incluídos no estudo 68 doentes (Tabela 1), 3 do género feminino e 65 do género masculino, com idade média de 54,8 ($\pm 10,2$) anos e mediana de 55 anos (34-87) (Figura 19). Quanto ao tipo de tumor, o carcinoma espinocelular foi o mais frequente, com 64 casos, seguido do adenocarcinoma com 3 casos e 1 linfopitelioma. A laringe foi o local tumoral com maior frequência, com 29 casos, seguido da orofaringe com 13 casos. Relativamente ao estadio, a maioria dos doentes foram diagnosticados com estadio IV (33 casos), no entanto não foi possível determinar o estadio de 3 doentes (Tabela 1).

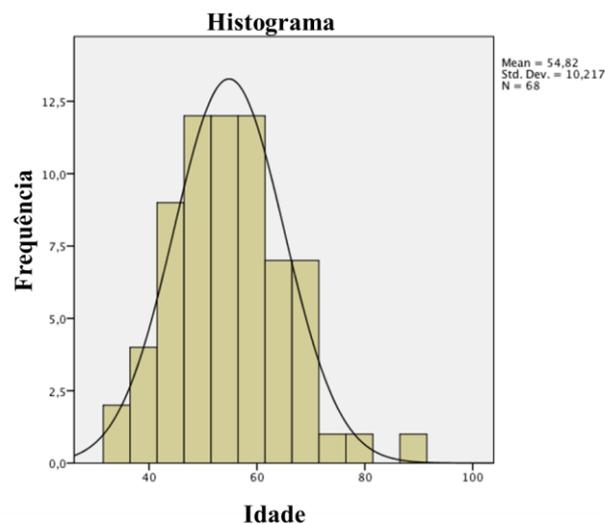


Figura 19: Gráfico representativo da distribuição normal das idades.

Quanto ao estilo de vida, foi possível saber os hábitos tabágicos e etílicos de 65 doentes, em que a maioria era fumador (55/63) e consumidor excessivo de forma continuada de álcool (56/63). Quanto ao tabaco, a média de UMA* (Unidade Maço Ano) foi de $43,4 \pm 30,8$ e mediana 40 (2,2-200).

*UMA calculada através da seguinte fórmula: $(n^\circ \text{cigarros}/\text{dia} * n^\circ \text{anos fumador}) / 20$.

Tabela 1: Caracterização da população em estudo.

Variáveis	n (%)
Género (n=68)	
Masculino	65 (95,6)
Feminino	3 (4,4)
Tipo de tumor (n=68)	
Adenocarcinoma	3 (4,4)
Carcinoma Espinoceular	64 (94,1)
Carcinoma Linfoepitelial	1 (1,5)
Local do tumor (n=68)	
<u>Cavidade Oral</u>	<u>9 (13,2)</u>
Língua	7 (10,3)
Pavimento da boca	2 (2,9)
<u>Cavidade Oral + Faringe</u>	<u>5 (7,4)</u>
<u>Faringe</u>	<u>16 (23,5)</u>
<i>Orofaringe</i>	<i>13 (19,1)</i>
Amígdalas	5 (7,4)
Palato mole/úvula	2 (2,9)
Orofaringe	6 (8,8)
<i>Hipofaringe</i>	<i>2 (2,9)</i>
<i>Faringe</i>	<i>1 (1,5)</i>
<u>Faringolaringe</u>	<u>5 (7,4)</u>
<u>Laringe</u>	<u>29 (42,6)</u>
Laringe	24 (35,3)
Cordas vocais	5 (7,3)
<u>Fossas Nasais</u>	<u>3 (4,4)</u>
<u>Nasofaringe</u>	<u>1 (1,5)</u>
Estadio (n=65)	
I	9 (13,2)
II	10 (14,7)
III	13 (19,1)
IV	33 (48,6)
Hábitos tabágicos (n=63)	
Não fumador	8 (12,7)
Fumador	55 (87,3)
Hábitos etílicos (n=63)	
Não consumidor	3 (4,8)
Consumidor	56 (88,9)
Ocasionais	4 (6,3)

Dos 68 doentes, foi obtida saliva de 66 doentes, mas só foi possível obter amostras de tecido de 42 doentes, uma vez que 15 doentes foram tratados com quimioterapia/radioterapia (não houve intervenção cirúrgica), 6 não tinham ainda efetuado biópsia/cirurgia à data do estudo e em 5 não foi possível obter amostra.

2. DETEÇÃO DE DNA VIRAL

2.1. Detecção de HPV

A prevalência global de HPV nas biópsias foi de 7,1% (3/42), dois (2/40) pertencentes a doentes do género masculino e um ao género feminino (1/2) (Tabela 2). Dois dos casos positivos foram detetados em doentes com idades inferiores a 55 anos e outro com idade superior a 62 anos. Os três casos foram diagnosticados com carcinoma espinocelular, dois da faringe (amígdala e base da língua) e outro da laringe (corda vocal direita). Relativamente ao estadio, verificou-se que, dos casos HPV positivos, dois encontravam-se em estadios intermédios (II e III), no outro não foi possível determinar o estadio por falta de informação clínica (Tabela 2). Apesar de não ser estatisticamente significativo, verificou-se também que, nos tecidos, os três doentes positivos para HPV eram fumadores, e que dois deles eram consumidores de álcool (Tabela 2).

Quanto à deteção de HPV na saliva, apenas 3,0% (2/66) dos doentes apresentavam DNA viral na saliva. De realçar ainda que os dois casos positivos na saliva correspondiam a dois dos três casos positivos no tecido, sendo que num deles não foi possível identificar HPV na saliva. Dos dois casos um era do género masculino (1/63) e outro do género feminino (1/3) e ambos correspondiam a doentes com idades inferiores a 55 anos e diagnosticados com carcinoma espinocelular, um localizado na faringe (amígdala) e o outro na cavidade oral (base da língua). Quanto ao estadio verificou-se que os casos positivos correspondiam aos doentes com estadio II e outro ao estadio III. Na saliva, os dois casos positivos pertenciam a fumadores, sendo que um deles era consumidor pesado de álcool (Tabela 2).

A genotipagem de HPV por PCR-RFLP não foi conclusiva, no entanto através da realização de PCR específico para HPV16 verificámos que os dois casos positivos na saliva e no tecido eram de HPV16. Relativamente ao terceiro caso positivo no tecido não foi possível determinar qual o tipo de HPV.

Tabela 2: Tabela demonstrativa do número de casos positivos e negativos para o HPV.

	Biópsias			Saliva		
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	<i>P</i>	Negativo n (%)	Positivo n (%)	<i>P</i>
Género						
Masculino	38 (95,0)	2 (5,0)	0,139	62 (98,4)	1 (1,6)	0,09
Feminino	1 (50,0)	1 (50,0)		2 (66,7)	1 (33,3)	
Idade (anos)						
<49	10 (90,9)	1 (9,1)	0,797	17 (94,4)	1 (5,6)	0,582
49-55	9 (90,0)	1 (10,0)		15 (93,8)	1 (6,2)	
56-62	10 (100)	---		16 (100)	---	
>62	10 (90,9)	1 (9,1)		16 (100)	---	
Tipo de Tumor						
Adenocarcinoma	2 (100)	---	0,883	3 (100)	---	0,936
Carcinoma espinocelular	36 (92,3)	3 (7,7)		60 (96,8)	2 (3,2)	
Carcinoma linfoepitelial	1 (100)	---		1 (100)	---	
Local do tumor						
Faringe + Cavidade Oral	16 (88,8)	2 (11,2)	0,658	26 (92,9)	2 (7,1)	0,678
Faringolaringe	3 (100)	---		5 (100)	---	
Fossas Nasais	2 (100)	---		3 (100)	---	
Laringe	17 (89,5)	1 (5,25)		29 (100)	---	
Nasofaringe	1 (100)	---		1 (100)	---	
Estadio						
I	7 (100)	---	0,443	9 (100)	---	0,256
II	8 (88,9)	1 (11,1)		8 (88,9)	1 (11,1)	
III	8 (88,9)	1 (11,1)		12 (92,3)	1 (7,7)	
IV	16 (100)	---		32 (100)	---	
Hábitos tabágicos						
Não fumador	6 (100)	---	0,606	7 (100)	---	0,782
Fumador	31 (91,2)	3 (8,8)		52 (96,3)	2 (3,7)	
Hábitos etílicos						
Não consumidor	1 (50,0)	1 (50,0)	0,046	2 (66,7)	1 (33,3)	0,011
Consumidor	34 (94,4)	2 (5,6)		53 (98,2)	1 (1,8)	
Ocasionais	2 (100)	---		4 (100)	---	

P – Coeficiente de Pearson.

2.2. Detecção de EBV

A frequência de EBV no tecido tumoral foi de 52,4% (22/42), sendo que todos os positivos eram de doentes do género masculino (22/40). Dos casos positivos, 20 pertenciam a doentes diagnosticados com carcinoma espinocelular (cavidade oral, faringe e laringe), um carcinoma linfoepitelial e outro adenocarcinoma. Os casos positivos encontram-se distribuídos de forma semelhante pelos diferentes grupos etários e nos diferentes estadios, sendo mais frequente nos doentes com estadio II (77,8%) (Tabela 3). Em relação aos hábitos tabágicos e etílicos, a distribuição do EBV é muito semelhante. Assim, 16 dos 20 casos positivos eram fumadores, sendo que os 20 doentes consumiam álcool, 18 dos quais eram consumidores pesados.

A deteção de EBV na saliva mostrou que 74,2% (49/66) dos casos eram positivos, sendo que 3 (3/3) pertenciam ao género feminino e 46 (46/63) ao género masculino. Os casos positivos encontram-se distribuídos de forma semelhante pelos diferentes grupos etários com elevada frequência, e a grande maioria está presente em doentes diagnosticados com carcinoma espinocelular (77,4%). Quanto à localização do tumor os mais frequentes foram na faringe/cavidade oral e laringe. Verificou-se também que a excreção de EBV na saliva, apesar de ser encontrado em todos os estadios, foi mais frequente nos doentes com estadios II, III e IV (Tabela 3). Relativamente aos hábitos tabágicos e etílicos, 43 dos 45 casos positivos na saliva pertenciam a fumadores e consumidores pesados de álcool.

Tabela 3: Tabela demonstrativa do número de casos positivos e negativos para o EBV.

	Biópsias			Saliva		
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	<i>P</i>	Negativo n (%)	Positivo n (%)	<i>P</i>
Género						
Masculino	18 (45,0)	22 (55,0)	0,221	17 (27,0)	46 (73,0)	0,403
Feminino	2 (100)	---		---	3 (100)	
Idade (anos)						
<49	5 (45,5)	6 (54,5)	0,993	4 (22,2)	14 (77,8)	0,944
49-55	5 (50,0)	5 (50,0)		5 (31,3)	11 (68,8)	
56-62	5 (50,0)	5 (50,0)		4 (25,0)	12 (75,0)	
>62	5(45,5)	6 (54,5)		4 (25,0)	12 (75,0)	
Tipo de Tumor						
Adenocarcinoma	1 (50,0)	1 (50,0)	0,627	2 (66,7)	1 (33,3)	0,054
Carcinoma espinocelular	19 (48,7)	20 (51,3)		14 (22,6)	48 (77,4)	
Carcinoma linfoepitelial	---	1 (100)		1 (100)	---	
Local do tumor						
Faringe + cavidade oral	9 (50,0)	9 (50,0)	0,417	4 (14,3,3)	24 (85,7)	0,034
Faringolaringe	1 (33,3)	2 (66,7)		1 (20,0)	4 (80,0)	
Fossas Nasais	1 (50,0)	1 (50,0)		2 (66,7)	1 (33,3)	
Laringe	9 (50,0)	9 (50,0)		9 (31,0)	20 (69,0)	
Nasofaringe	---	1 (100)		1 (100)	---	
Estadio						
I	3 (42,9)	4 (57,1)	0,359	5 (55,6)	4 (44,4)	0,299
II	2 (22,2)	7 (77,8)		2 (22,2)	7 (77,8)	
III	7 (77,8)	2 (22,2)		3 (23,1)	10 (76,9)	
IV	7 (43,8)	9 (56,3)		6 (18,8)	26 (81,3)	
Hábitos tabágicos						
Não fumador	2 (33,3)	4 (66,7)	0,331	5 (71,4)	2 (28,6)	0,011
Fumador	18 (52,9)	16 (47,1)		11 (20,4)	43 (79,6)	
Hábitos etílicos						
Não consumidor	2 (100)	---	0,160	1 (33,3)	2 (66,7)	0,020
Consumidor	18 (50,0)	18 (50,0)		11 (20,4)	43 (79,6)	
Ocasionais	---	2 (100)		4 (100)	---	

P – Coeficiente de Pearson.

2.2.1. Relação entre a presença de vírus na saliva e nos tecidos tumorais

Para avaliar a possibilidade de utilizar a saliva como uma amostra útil na pesquisa de infecções virais como marcadores preditivos de patologia da cavidade oral fomos comparar os resultados encontrados nos mesmos doentes relativos à excreção de vírus na saliva e a presença de vírus no tumor.

Relativamente ao HPV, observamos que nos carcinomas HPV positivos (n=3), 2 eram positivos para HPV na saliva. Por outro lado não foi encontrado qualquer caso positivo para HPV na saliva nos casos dos doentes com carcinomas HPV negativos (n=37) (Figura 21). A análise revelou que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo. ($p=0,004$).

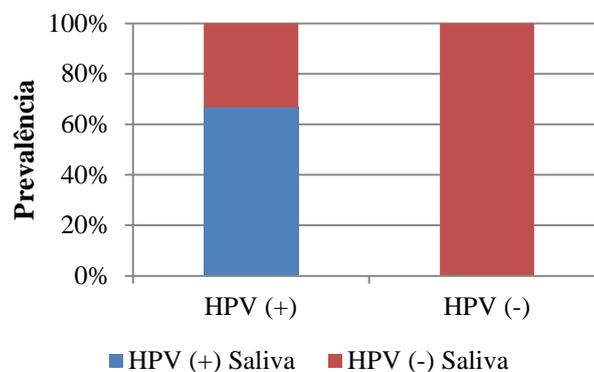


Figura 20: Gráfico representativo da relação entre a presença de HPV na saliva e nos tecidos tumorais.

Relativamente aos casos de carcinoma EBV positivos no tecido (n=21), observa-se que 76.2% (16/21) dos casos apresentavam excreção de EBV na saliva. Do mesmo modo, observamos que nos casos de carcinomas EBV negativos (n=19), 78.9% (15/19) eram positivos para EBV na saliva (Figura 20). A comparação mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo ($p=0,569$).

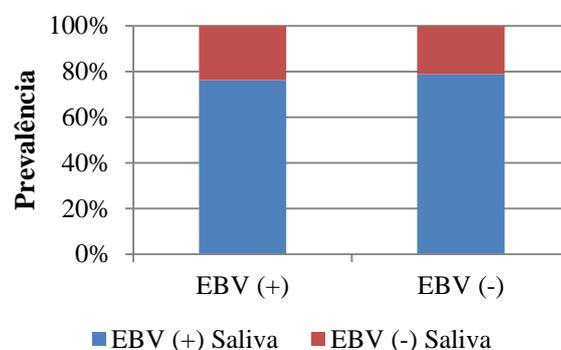


Figura 21: Gráfico representativo da relação entre a presença de EBV na saliva e nos tecidos tumorais.

V. DISCUSSÃO

O cancro de cabeça e pescoço é o quinto com maior incidência em Portugal e representa um grave problema de saúde pública com cerca de 43 000 novos casos por ano (Ferlay et al., 2010). Em adição ao tabaco e álcool, os vírus foram também associados ao desenvolvimento deste tipo de patologias, nomeadamente o Vírus do Papiloma Humano e o Vírus Epstein-Barr que estão envolvidos na carcinogénese dos HNC, especialmente nos carcinomas das células escamosas e nos linfoepiteliais, respetivamente (Dobrossy, 2005, Singh, 2008).

No desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço para além dos agentes virais estão também incluídos fatores associados ao comportamento e estilo de vida do indivíduo, em que o fumo do tabaco, consumo de álcool e outros comportamentos de risco, como mudança nos hábitos sexuais, são fatores determinantes para o aumento do risco de desenvolvimento destas neoplasias (Dobrossy, 2005).

Sendo uma patologia que aparece frequentemente em estadios mais avançados, motivo pelo qual existe uma alta mortalidade, é importante o desenvolvimento de fatores que permitam prever/identificar precocemente lesões da cavidade oral, faringe e laringe, que possam auxiliar no diagnóstico e também no prognóstico dos doentes (Heck et al., 2010, Ferlay et al., 2010).

Com este estudo pretendemos caracterizar a prevalência da infeção por HPV e EBV em carcinomas de cabeça e pescoço e estudar a possibilidade de utilização da saliva como amostra não invasiva, na pesquisa de infeções virais como marcadores preditivos de patologia da cavidade oral, uma vez que é uma área pouco explorada, não existindo muitos estudos que descrevam a prevalência destes vírus na saliva de doentes com HNC.

1. HPV E CANCRO DE CABEÇA E PESCOÇO

Analisando os resultados obtidos, verificámos que a prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço é muito baixa (7,1%), tendo sido encontrados apenas três casos positivos para HPV nos tecidos, todos eles pertencentes a doentes com carcinoma das células escamosas (amígdala, base da língua e corda vocal direita). A prevalência de HPV na nossa população, apesar de ser baixa, está de acordo com o descrito na literatura, que refere que, apesar de muito variável, a prevalência de HPV em tumores de cabeça e pescoço varia

entre 5-20% (Psyrrri and DiMaio, 2008) (Tabela 4). Segundo a literatura, a prevalência de HPV nos HNC é maior na cavidade oral e orofaringe, incluindo lábio, amígdalas, língua e base da língua (Rautava et al., 2012a, Anderson et al., 2007, Licitra et al., 2006a, Huang et al., 2012). Analisando apenas os casos de carcinomas da cavidade oral e da faringe, a prevalência aumenta ligeiramente, para 11,2% (2/18). Assim, a baixa prevalência de HPV, na população em estudo, pode ser explicada pelo facto de apenas existirem 5 casos de doentes com carcinoma da amígdala e 7 da língua, o que requer uma confirmação dos valores com um maior número de casos destas patologias.

Os resultados obtidos, tanto nesta população como em outros artigos publicados, dependem muito da população em estudo e da metodologia utilizada (Tabela 4). Como podemos verificar a metodologia escolhida por nós para a deteção de HPV é também utilizada por diversos autores, que obtiveram uma maior prevalência de HPV. No entanto, apesar da metodologia usada e da população em estudo serem diferentes de estudo para estudo, as prevalências de HPV variam muito. Na tabela 4 podemos observar ainda que a sensibilidade do método é variável, e que em estudos que, na mesma amostragem usaram dois métodos diferentes, os resultados são discordantes (Koyama et al., 2007, Boy et al., 2006).

Relativamente à genotipagem destes casos verificámos que dois casos positivos nos tecidos eram positivos para HPV16. Estudos recentes têm vindo a reportar que dos carcinomas de cabeça e pescoço HPV positivos, cerca de 90% são positivo para HPV16 (Psyrrri and DiMaio, 2008, Schwartz et al., 1998a). Neste estudo, com apenas 2 casos genotipados em 3, apesar de serem HPV16, não é possível concluir de forma clara esta associação.

Relativamente à deteção de DNA do HPV na saliva verificámos que a prevalência de HPV em tumores da cabeça e pescoço é muito baixa, tendo sido encontrados apenas dois casos positivos para HPV, sendo ambos positivos para HPV16. Não existem muitos estudos que tenham feito deteção de HPV na saliva, no entanto a prevalência encontrada é geralmente baixa, rondando os 10,3% (Adamopoulou et al., 2008, SahebJamee et al., 2009). Os nossos resultados mostram que apenas existem casos positivos em doentes com idades inferiores a 55 anos, o que vai de encontro à literatura que refere que o HPV é um vírus de transmissão sexual cuja prevalência global diminui a partir dos 50 anos (Thibaudeau et al., 2013). No entanto, apesar da prevalência de HPV ter sido muito baixa na nossa população, verificou-se que nos casos de carcinomas HPV negativos não houve nenhum caso onde ocorreu

secreção de HPV na saliva, o que nos leva a supor que a detecção de DNA de HPV na saliva poderá ser útil como biomarcador preditivo de patologias de cabeça e pescoço e que deverá ser melhor estudado como marcador de diagnóstico não invasivo.

Foi ainda possível observar que, dos fatores de risco mais associados ao desenvolvimento de HNC, os hábitos tabágicos e etílicos são muito frequentes nesta população. Sabe-se que agentes químicos, como o fumo do tabaco, atuam como iniciadores da carcinogénese, causando danos ou mutações no DNA. As células alteradas permanecem num estado latente até que sobre elas atue um agente promotor, que vai estimular a proliferação destas células. Pensa-se que alguns vírus podem atuar como promotores da carcinogénese, aproveitando-se da instabilidade das células. Assim, torna-se importante estudar melhor a correlação destes fatores com a presença/ausência de HPV, para clarificar o papel deste vírus no desenvolvimento destas patologias. Sabendo da variabilidade de resultados existentes na literatura, pensamos que seja importante aumentar ainda mais o grupo de doentes para poder fazer um estudo comparativo de acordo com o subtipo de cancro, assim como adicionar ao estudo um grupo controlo para normalizar os resultados.

Tabela 4: Tabela demonstrativa das diferentes metodologias utilizadas por diversos autores na detecção de HPV.

Ano	Autor	Metodologia	Tipo de amostra	População	Nº Pos (%)	HPV detetados	Tipo de cancro
2007	Koichi Koyama (Koyama et al., 2007)	PCR MY09/11	Tecido em parafina	20	20 (100)	16, 18, 22, 38, 70	Língua, gengiva, boca
		ISH-Tyramide	Tecido em parafina	20	0		
2006	C.-W. Luo (Luo et al., 2007)	Nested PCR	Raspagem	51	13 (25,5)	16, 18, 33, 52, 39, 72, 66, 11, 58	Língua, pavimento da boca, gengiva, lábio
2006	Masaru Sugiyama (Sugiyama et al., 2007)	PCR HPV16 E7	Tecido em parafina	66	24 (36,4)	16	Língua, gengiva, outros
2006	Lucia Giovannelli (Giovannelli et al., 2006)	PCR MY09/11 PCR GP5+/6+	Raspagem	17	7 (41,2)	18, 6, 16, 33, 53	Cavidade oral
2006	Md. Golam Sabbir (Golam Sabbir et al., 2006)	PCR MY09/11	Tecido	84	65 (77,4)	16, 18	Cavidade oral e laringe
2005	Sonja Boy (Boy et al., 2006)	Real time PCR	Tecido em parafina	59	7 (11,9)	18	Cavidade Oral
		ISH	Tecido em parafina	59	0		
2005	Bengt Goran Hanson (Hansson et al., 2005)	Nested PCR	Tecido	130	34 (26,2)	16, 33, 32, 59, 76, 70 16, 33, 10, 32, 45, 59, 76, 13, 18, 58, 62	Língua, pavimento da boca, orofaringe
		MY09/11 e GP5+/6+	Lavagem bucal	131	39 (29,8)		
2012	Linda Marklund (Marklund et al., 2012)	PCR GP5+/6+	Tecido em parafina	69	12 (17,4)	16, 18, 33	Orofaringe
2012	Michelle M. Rietbergen (Rietbergen et al., 2013)	PCR GP5+/6+ + PCR-EIA	Tecido em parafina	240	41 (17,1)	16, 33	Orofaringe
2012	Takatsugu Mizumachi (Mizumachi et al., 2013)	Multiplex PCR	Tecido em parafina	71	23 (32,4)	16, 18, 58	Orofaringe
2012	Anaëlle Duray (Duray et al., 2012)	PCR GP5+/6+	Tecido em parafina	162	65 (40,1)	---	Língua, Lábio, palato
2012	Jaana Rautava (Rautava et al., 2012b)	Nested PCR MY09/11 e GP5+/6+	Tecido	106	60 (56,6)	2, 6, 11, 16, 18, 31, 35, 59, 30, 43, 56, 57, 58, 66	Cavidade oral, faringe, laringe
2008	Maria Adamopoulou (Adamopoulou et al., 2008)	PCR MY09/11	Saliva	68	7 (10,3)	11, 16, 18, 32	Cavidade oral

2. EBV E CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO

Relativamente à infeção por EBV, a sua prevalência nos doentes com carcinoma de cabeça e pescoço foi bastante elevada nas amostras de tecido (52,4%), verificando-se uma distribuição muito semelhante em todos os grupos etários. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que o EBV é um vírus com distribuição ubíqua cuja infeção primária ocorre normalmente durante os primeiros anos de vida e que infeta cerca de 80-90% da população mundial (Kuppers, 2003). Sabe-se ainda que após infeção primária os indivíduos permanecem portadores vitalícios do vírus, que permanece num estado latente nos linfócitos B por longos períodos de tempo, podendo ocorrer reativações frequentes que permitem quer a infeção de novas células, quer a reativação dos mecanismos de latência que podem conduzir à transformação maligna na presença de carcinogénicos como os existentes no fumo do tabaco e o álcool (Sousa et al., 2011). Adicionalmente, o EBV está associado com mais frequência a carcinomas da nasofaringe, principalmente os indiferenciados (Young and Murray, 2003). Neste estudo, apesar de estar distribuída de forma muito semelhante, a prevalência de EBV foi maior nos carcinomas da faringe, laringe e cavidade oral, sendo que o único caso de carcinoma da nasofaringe foi também positivo para EBV. Como podemos observar na tabela 5, são várias as metodologias utilizadas na deteção de EBV, todas elas apresentando elevada sensibilidade. A utilização do PCR em tempo real tem vindo a ser cada vez mais utilizada por vários autores em diferentes tipos de amostras (Li et al., 2013, Pow et al., 2011, Hassen et al., 2011). O protocolo de Real time PCR utilizado neste estudo foi já descrito em trabalhos anteriores e em diferentes tipos de amostras (Marinho-Dias et al., 2013).

Quanto à deteção de EBV na saliva verificou-se também uma elevada prevalência na saliva deste vírus em todas as faixas etárias e em todos os estadios, o que seria de esperar uma vez que é um vírus de distribuição ubíqua, como já foi referido, estando presente em indivíduos saudáveis e em doentes. Verificámos também que não existem diferenças significativas entre a presença de EBV nos tecidos e na saliva. De facto encontrámos nos carcinomas EBV negativos uma elevada percentagem de casos em que ocorreu também excreção de EBV na saliva. Desta forma, a utilização da deteção de EBV na saliva como biomarcador preditivo de patologias da cavidade oral não parece ter um valor muito importante.

Neste estudo, a relação entre o fumo do tabaco e o álcool com o EBV não está bem clara, uma vez que a proporção dos indivíduos que fumam e consomem álcool e que são positivos ou negativos para o EBV é muito semelhante. Cerca de metade dos fumadores são EBV positivos e a restante metade é negativa, o mesmo se passando no caso dos consumidores de álcool. Assim, será necessário esclarecer qual o papel do EBV na carcinogénese. No entanto, tal como acontece no caso do HPV, o fumo do tabaco e o álcool serão os iniciadores e o EBV o promotor, aproveitando-se da instabilidade das células dando o seu contributo no desenvolvimento das neoplasias.

Tabela 5: Tabela demonstrativa das diferentes metodologias utilizadas por diversos autores na detecção de EBV.

Ano	Autor	Metodologia	Tipo de amostra	População	Nº Pos (%)	Tipo de cancro
2010	Hong-lei Chen (Chen et al., 2010)	ISH	Tecido em parafina	35	30 (85,7)	Nasofaringe
		FISH	Tecido em parafina	35	32 (91,4)	
2009	Bijan Khademi (Khademi et al., 2009)	PCR	Tecido em parafina	12	10 (83,3)	Nasofaringe
2006	N. Mirzamani (Mirzamani et al., 2006)	ISH	Tecido em parafina	20	19 (95,0)	Nasofaringe
2002	A. Szkaradkiewicz (Szkaradkiewicz et al., 2002)	ELISA	Tecido	28	24 (85,7)	Amígdala, língua
2002	Lars Peter Sand (Sand et al., 2002)	Nested PCR	Tecido	29	11 (37,9)	Cavidade Oral
2001	Shinn-yn Lin (Lin et al., 2001)	PCR	Esfregaço	38	36 (94,7)	Nasofaringe

CONCLUSÃO

Com o objectivo de estudar a infecção por HPV e EBV em carcinomas de cabeça e pescoço, desenvolvemos um estudo prospectivo com todos os doentes diagnosticados com esta patologia entre Março e Setembro de 2013. Este estudo demonstrou que a prevalência de carcinomas associado ao HPV é de 7,1% e ao EBV de 52,4%, ficando por esclarecer por completo o qual o papel destes vírus na etiologia destas patologias na medida em que a presença de outros factores de risco como o tabagismo e o consumo de álcool são muito frequentes na nossa população.

Este é o primeiro estudo realizado em Portugal onde se avaliou a frequência de HPV e EBV em saliva de doentes com carcinoma de cabeça e pescoço. Observamos ainda que não existe excreção de HPV na saliva dos doentes com carcinomas HPV negativos, enquanto que em 2 dos 3 carcinomas HPV positivos observou-se a excreção de HPV, o que nos leva a concluir que a excreção de HPV na saliva deverá ser estudada como um possível marcador de patologia maligna da cavidade oral. Pelo contrário, relativamente ao EBV, concluímos que a excreção de EBV na saliva não pode ser utilizada como biomarcador preditivo da existência de carcinoma de cabeça e pescoço, uma vez que nos casos de carcinoma EBV negativos existe igualmente excreção de EBV na saliva. Apesar de serem ainda dados preliminares e necessitarem de um estudo mais aprofundado, estes dados são um passo importante para o melhor conhecimento destas patologias que carecem de uma confirmação numa série maior de casos e num grupo controlo.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ADAMOPOULOU, M., VAIRAKTARIS, E., PANIS, V., NKENKE, E., NEUKAM, F. W. & YAPIJAKIS, C. 2008. HPV detection rate in saliva may depend on the immune system efficiency. *In Vivo*, 22, 599-602.
- ALVARENGA, P. 2010. *RORENO, Registo Oncológico Regional do Norte* [Online]. Available: <http://www.roreno.com.pt/pt/sobre-nos/missao.html>.
- ANDERSON, C. E., MCLAREN, K. M., RAE, F., SANDERSON, R. J. & CUSCHIERI, K. S. 2007. Human papilloma virus in squamous carcinoma of the head and neck: a study of cases in south east Scotland. *J Clin Pathol*, 60, 439-41.
- BANKS, L., PIM, D. & THOMAS, M. 2012. Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12, 877-86.
- BEASLEY, R. P., LIN, C.-C., HWANG, L.-Y. & CHIEN, C.-S. 1981. HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND HEPATITIS B VIRUS: A Prospective Study of 22 707 Men in Taiwan. *The Lancet*, 318, 1129-1133.
- BEDELL, M. A., HUDSON, J. B., GOLUB, T. R., TURYK, M. E., HOSKEN, M., WILBANKS, G. D. & LAIMINS, L. A. 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*, 65, 2254-60.
- BIRON, C. A. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol*, 10, 383-90.
- BOY, S., RENSBURG, E. J. V., ENGELBRECHT, S., DREYER, L., VAN HEERDEN, M. & VAN HEERDEN, W. 2006. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological agent or contamination? *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 35, 86-90.
- BRAY, F., SANKILA, R., FERLAY, J. & PARKIN, D. M. 2002. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *European Journal of Cancer*, 38, 99-166.
- BUCK, C. B., THOMPSON, C. D., PANG, Y. Y. S., LOWY, D. R. & SCHILLER, J. T. 2005. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol*, 79, 2839-2846.
- CANADAS, M. P., DARWICH, L., SIRERA, G., CIRIGLIANO, V., BOFILL, M., CLOTET, B., VIDELA, S. & GROUP, H.-H. S. 2010. New molecular method for

- the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clin Microbiol Infect*, 16, 836-42.
- CATARINO, R. J., BREDÁ, E., COELHO, V., PINTO, D., SOUSA, H., LOPES, C. & MEDEIROS, R. 2006. Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, 28, 603-8.
- CHANG, Y., CESARMAN, E., PESSIN, M. S., LEE, F., CULPEPPER, J., KNOWLES, D. M. & MOORE, P. S. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 266, 1865-9.
- CHEN, H. L., PENG, J., ZHU, X. B., GAO, J., XUE, J. L., WANG, M. W. & XIA, H. S. 2010. Detection of EBV in nasopharyngeal carcinoma by quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Exp Mol Pathol*, 89, 367-71.
- COBRINIK, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24, 2796-809.
- COLACINO, J. A., ARTHUR, A. E., DOLINOY, D. C., SARTOR, M. A., DUFFY, S. A., CHEPEHA, D. B., BRADFORD, C. R., WALLINE, H. M., MCHUGH, J. B., D'SILVA, N. J., CAREY, T. E., WOLF, G. T., TAYLOR, J. M. G., PETERSON, K. E. & ROZEK, L. S. 2012. Pretreatment dietary intake is associated with tumor suppressor DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas. *Epigenetics*, 7, 883-891.
- DAMANIA, B. 2007. DNA tumor viruses and human cancer. *Trends in Microbiology*, 15, 38-44.
- DE VILLIERS, E. M., FAUQUET, C., BROKER, T. R., BERNARD, H. U. & ZUR HAUSEN, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- DE VRIES, N., VAN ZANDWIJK, N. & PASTORINO, U. 1991. The EUROSCAN Study. EUROSCAN Steering Committee. *Br J Cancer*, 64, 985-9.
- DIMOVA, D. K. & DYSON, N. J. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 24, 2810-26.
- DOBROSSY, L. 2005. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24, 9-17.
- DURAY, A., DESCAMPS, G., DECAESTECKER, C., REMMELINK, M., SIRTAINÉ, N., LECHIEN, J., ERNOUX-NEUFCEUR, P., BLETARD, N., SOMJA, J., DEPUYDT, C. E., DELVENNE, P. & SAUSSEZ, S. 2012. Human papillomavirus

- DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *The Laryngoscope*, 122, 1558-1565.
- DURST, M., GLITZ, D., SCHNEIDER, A. & ZUR HAUSEN, H. 1992. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*, 189, 132-40.
- FARRELL, P. J. 2002. Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer? *European Journal of Cancer*, 38, 1815-6.
- FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- GALLO, G., BIBBO, M., BAGELLA, L., ZAMPARELLI, A., SANSEVERINO, F., GIOVAGNOLI, M. R., VECCHIONE, A. & GIORDANO, A. 2003. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*, 56, 532-6.
- GHITTONI, R., ACCARDI, R., HASAN, U., GHEIT, T., SYLLA, B. & TOMMASINO, M. 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, 40, 1-13.
- GIOVANNELLI, L., CAMPISI, G., COLELLA, G., CAPRA, G., DI LIBERTO, C., CALECA, M. P., MATRANGA, D., D'ANGELO, M., LO MUZIO, L. & AMMATUNA, P. 2006. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther*, 10, 49-55.
- GOLAM SABBIR, M., ROY, A., MANDAL, S., DAM, A., ROYCHOUDHURY, S. & PANDA, C. K. 2006. Deletion mapping of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients: correlation with prognosis of the tumour. *International Journal of Experimental Pathology*, 87, 151-161.
- GOLDENBERG, D., GOLZ, A., NETZER, A., ROSENBLATT, E., RACHMIEL, A., GOLDENBERG, R. F. & JOACHIMS, H. Z. 2001. Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. *American Journal of Otolaryngology*, 22, 197-205.
- GRIEP, A. E., HERBER, R., JEON, S., LOHSE, J. K., DUBIELZIG, R. R. & LAMBERT, P. F. 1993. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol*, 67, 1373-84.

- GRINDE, B. 2013. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*, 5.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANSSON, B. G., ROSENQUIST, K., ANTONSSON, A., WENNERBERG, J., SCHILDT, E. B., BLADSTROM, A. & ANDERSSON, G. 2005. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*, 125, 1337-44.
- HARLEY, C. B., FUTCHER, A. B. & GREIDER, C. W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-60.
- HASSEN, E., FARHAT, K., GABBOUJ, S., BOUAOUINA, N., ABDELAZIZ, H. & CHOUCANE, L. 2011. Epstein-Barr virus DNA quantification and follow-up in Tunisian nasopharyngeal carcinoma patients. *Biomarkers*, 16, 274-80.
- HEBNER, C. M. & LAIMINS, L. A. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, 16, 83-97.
- HECK, J. E., BERTHILLER, J., VACCARELLA, S., WINN, D. M., SMITH, E. M., SHAN'GINA, O., SCHWARTZ, S. M., PURDUE, M. P., PILARSKA, A., ELUFNETO, J., MENEZES, A., MCCLEAN, M. D., MATOS, E., KOIFMAN, S., KELSEY, K. T., HERRERO, R., HAYES, R. B., FRANCESCHI, S., WUNSCH-FILHO, V., FERNANDEZ, L., DAUDT, A. W., CURADO, M. P., CHEN, C., CASTELLSAGUE, X., FERRO, G., BRENNAN, P., BOFFETTA, P. & HASHIBE, M. 2010. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*, 39, 166-81.
- HO, T., WEI, Q. & STURGIS, E. M. 2007. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 29, 682-99.
- HUANG, H., ZHANG, B., CHEN, W., ZHOU, S. M., ZHANG, Y. X., GAO, L., XU, Z. G., QIAO, Y. L. & TANG, P. Z. 2012. Human papillomavirus infection and prognostic predictors in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 891-6.

- JAVIER, R. T. & BUTEL, J. S. 2008. The history of tumor virology. *Cancer Res*, 68, 7693-706.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- KHADEMI, B., MAHMOUDI, J., MONABATI, A., MAGHSOUDI, B., ASHRAF, M. J., MOHAMMADIANPANAH, M., TABIBI, N., VALIBEIGI, B. & ABEDI, E. 2009. Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma using detection of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 gene in cervical metastatic lymph nodes. *Am J Otolaryngol*, 30, 95-100.
- KIM, N. W., PIATYSZEK, M. A., PROWSE, K. R., HARLEY, C. B., WEST, M. D., HO, P. L., COVIELLO, G. M., WRIGHT, W. E., WEINRICH, S. L. & SHAY, J. W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266, 2011-5.
- KIMURA, H. 2006. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection: is this an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency? *Rev Med Virol*, 16, 251-61.
- KLINGELHUTZ, A. J., FOSTER, S. A. & MCDUGALL, J. K. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380, 79-82.
- KLUMPP, D. J. & LAIMINS, L. A. 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*, 257, 239-46.
- KOYAMA, K., UOBE, K. & TANAKA, A. 2007. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 36, 18-24.
- KUPPERS, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 3, 801-12.
- LAJER, C. B. & VON BUCHWALD, C. 2010. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *Apmis*, 118, 510-9.
- LASSEN, P., ERIKSEN, J. G., HAMILTON-DUTOIT, S., TRAMM, T., ALSNER, J., OVERGAARD, J., DANISH, H. & NECK CANCER, G. 2010. HPV-associated p16-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol*, 94, 30-5.

- LAVECCHIA, C., TAVANI, A., FRANCESCHI, S., LEVI, F., CORRAO, G. & NEGRI, E. 1997. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncology*, 33, 302-312.
- LI, S. W., WANG, H., XIANG, Y. Q., ZHANG, H. B., LV, X., XIA, W. X., ZENG, M. S., MAI, H. Q., HONG, M. H. & GUO, X. 2013. Prospective study of prognostic value of Raf kinase inhibitory protein and pretreatment plasma Epstein-Barr virus DNA for distant metastasis in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, 35, 579-91.
- LICITRA, L., PERRONE, F., BOSSI, P., SUARDI, S., MARIANI, L., ARTUSI, R., OGGIONNI, M., ROSSINI, C., CANTU, G., SQUADRELLI, M., QUATTRONE, P., LOCATI, L. D., BERGAMINI, C., OLMI, P., PIEROTTI, M. A. & PILOTTI, S. 2006a. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24, 5630-6.
- LICITRA, L., PERRONE, F., BOSSI, P., SUARDI, S., MARIANI, L., ARTUSI, R., OGGIONNI, M., ROSSINI, C., CANTU, G., SQUADRELLI, M., QUATTRONE, P., LOCATI, L. D., BERGAMINI, C., OLMI, P., PIEROTTI, M. A. & PILOTTI, S. 2006b. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 5630-5636.
- LIN, C. T., LIN, C. R., TAN, G. K., CHEN, W. S., DEE, A. N. & CHAN, W. Y. 1997. The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *American Journal of Pathology*, 150, 1745-1756.
- LIN, S. Y., TSANG, N. M., KAO, S. C., HSIEH, Y. L., CHEN, Y. P., TSAI, C. S., KUO, T. T., HAO, S. P., CHEN, I. H. & HONG, J. H. 2001. Presence of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in the nasopharyngeal swabs from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, 23, 194-200.
- LO, K. W., TO, K. F. & HUANG, D. P. 2004. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell*, 5, 423-8.
- LUCENTEFORTE, E., GARAVELLO, W., BOSETTI, C. & LA VECCHIA, C. 2009. Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral oncology*, 45, 461-467.

- LUO, C. W., ROAN, C. H. & LIU, C. J. 2007. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 36, 153-158.
- LUO, L. Z., WERNER, K. M., GOLLIN, S. M. & SAUNDERS, W. S. 2004. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat Res*, 554, 375-85.
- MARAN, A. G., WILSON, J. A. & GAZE, M. N. 1993. The nature of the head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 250, 127-32.
- MARINHO-DIAS, J., RIBEIRO, J., MONTEIRO, P., LOUREIRO, J., BALDAQUE, I., MEDEIROS, R. & SOUSA, H. 2013. Characterization of cytomegalovirus and epstein-barr virus infection in cervical lesions in Portugal. *J Med Virol*, 85, 1409-13.
- MARKLUND, L., NASMAN, A., RAMQVIST, T., DALIANIS, T., MUNCK-WIKLAND, E. & HAMMARSTEDT, L. 2012. Prevalence of human papillomavirus and survival in oropharyngeal cancer other than tonsil or base of tongue cancer. *Cancer Med*, 1, 82-8.
- MATZNER, I., SAVELYEVA, L. & SCHWAB, M. 2003. Preferential integration of a transfected marker gene into spontaneously expressed fragile sites of a breast cancer cell line. *Cancer Lett*, 189, 207-19.
- MCKAY, J. A. & MATHERS, J. C. 2011. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol (Oxf)*, 202, 103-18.
- MICHOR, F., IWASA, Y. & NOWAK, M. A. 2004. Dynamics of cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 4, 197-205.
- MIRZAMANI, N., SALEHIAN, P., FARHADI, M. & TEHRAN, E. A. 2006. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. *Exp Mol Pathol*, 81, 231-4.
- MIZUMACHI, T., KANO, S., SAKASHITA, T., HATAKEYAMA, H., SUZUKI, S., HOMMA, A., ORIDATE, N. & FUKUDA, S. 2013. Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*, 18, 824-8.
- MORK, J., LIE, A. K., GLATTRE, E., CLARK, S., HALLMANS, G., JELLUM, E., KOSKELA, P., MOLLER, B., PUKKALA, E., SCHILLER, J. T., YOUNGMAN,

- L., LEHTINEN, M. & DILLNER, J. 2001. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 344, 1125-1131.
- MULLEN, A. R. & DEBERARDINIS, R. J. 2012. Genetically-defined metabolic reprogramming in cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 552-9.
- MUNGER, K., BALDWIN, A., EDWARDS, K. M., HAYAKAWA, H., NGUYEN, C. L., OWENS, M., GRACE, M. & HUH, K. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78, 11451-60.
- MUNOZ, N., CASTELLSAGUE, X., DE GONZALEZ, A. B. & GISSMANN, L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1-10.
- MURRAY, P. G. & YOUNG, L. S. 2001. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med*, 3, 1-20.
- MURRAY, R. J., KURILLA, M. G., BROOKS, J. M., THOMAS, W. A., ROWE, M., KIEFF, E. & RICKINSON, A. B. 1992. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med*, 176, 157-68.
- NOBRE, R. J., DE ALMEIDA, L. P. & MARTINS, T. C. 2008. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol*, 42, 13-21.
- OZBUN, M. A. & MEYERS, C. 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, 71, 5161-5172.
- PAGANO, J. S., BLASER, M., BUENDIA, M. A., DAMANIA, B., KHALILI, K., RAAB-TRAUB, N. & ROIZMAN, B. 2004. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol*, 14, 453-71.
- PETT, M. & COLEMAN, N. 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*, 212, 356-67.
- POIESZ, B. J., RUSCETTI, F. W., MIER, J. W., WOODS, A. M. & GALLO, R. C. 1980. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 6815-9.

- POW, E. H., LAW, M. Y., TSANG, P. C., PERERA, R. A. & KWONG, D. L. 2011. Salivary Epstein-Barr virus DNA level in patients with nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Oral Oncol*, 47, 879-82.
- PSYRRI, A. & DIMAIO, D. 2008. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 5, 24-31.
- RAUTAVA, J., KUUSKOSKI, J., SYRJANEN, K., GRENMAN, R. & SYRJANEN, S. 2012a. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Clinical Virology*, 53, 116-120.
- RAUTAVA, J., KUUSKOSKI, J., SYRJANEN, K., GRENMAN, R. & SYRJANEN, S. 2012b. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Virol*, 53, 116-20.
- RIETBERGEN, M. M., LEEMANS, C. R., BLOEMENA, E., HEIDEMAN, D. A., BRAAKHUIS, B. J., HESSELINK, A. T., WITTE, B. I., BAATENBURG DE JONG, R. J., MEIJER, C. J., SNIJDERS, P. J. & BRAKENHOFF, R. H. 2013. Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 132, 1565-71.
- ROUS, P. 1979. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., *Experimental Medicine for Sept. 1, 1910*, vol. 12, pp.696-705. *The Journal of experimental medicine*, 150, 738-53.
- SAHA, A., MURAKAMI, M., KUMAR, P., BAJAJ, B., SIMS, K. & ROBERTSON, E. S. 2009. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol*, 83, 4652-69.
- SAHEBJAMEE, M., BOORGHANI, M., GHAFFARI, S. R., ATARBASHIMOGHADAM, F. & KEYHANI, A. 2009. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 14, e525-8.
- SAND, L. P., JALOULI, J., LARSSON, P. A. & HIRSCH, J. M. 2002. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93, 586-92.
- SANDOVAL, M., FONT, R., MANOS, M., DICENTA, M., QUINTANA, M. J., BOSCH, F. X. & CASTELLSAGUE, X. 2009. The role of vegetable and fruit consumption

- and other habits on survival following the diagnosis of oral cancer: a prospective study in Spain. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38, 31-9.
- SCHEFFNER, M., WERNESS, B. A., HUIBREGTSE, J. M., LEVINE, A. J. & HOWLEY, P. M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-1136.
- SCHWARTZ, S. M., DALING, J. R., DOODY, D. R., WIPF, G. C., CARTER, J. J., MADELEINE, M. M., MAO, E. J., FITZGIBBONS, E. D., HUANG, S., BECKMANN, A. M., MCDUGALL, J. K. & GALLOWAY, D. A. 1998a. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1626-36.
- SCHWARTZ, S. M., DALING, J. R., DOODY, D. R., WIPF, G. C., CARTER, J. J., MADELEINE, M. M., MAO, E. J., FITZGIBBONS, E. D., HUANG, S. X., BECKMANN, A. M., MCDUGALL, J. K. & GALLOWAY, D. A. 1998b. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 1626-1636.
- SINCLAIR, A. J., PALMERO, I., PETERS, G. & FARRELL, P. J. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J*, 13, 3321-8.
- SINGH, B. 2008. Molecular pathogenesis of head and neck cancers. *J Surg Oncol*, 97, 634-9.
- SINHA, P., LOGAN, H. L. & MENDENHALL, W. M. 2012. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otolaryngol*, 33, 130-6.
- SMITH, E. M., RUBENSTEIN, L. M., HAUGEN, T. H., HANSIKOVA, E. & TUREK, L. P. 2010. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes & Control*, 21, 1369-1378.
- SOUSA, H., SANTOS, A. M., PINTO, D. & MEDEIROS, R. 2007. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med*, 20, 731-41.
- SOUSA, H., SILVA, J., AZEVEDO, L., PINTO-CORREIA, A. L., CATARINO, R., PINTO, D., LOPES, C. & MEDEIROS, R. 2011. Epstein-Barr virus in healthy individuals from Portugal. *Acta Med Port*, 24, 707-12.

- STOLER, M. H., RHODES, C. R., WHITBECK, A., WOLINSKY, S. M., CHOW, L. T. & BROKER, T. R. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol*, 23, 117-28.
- STOPPLER, H., HARTMANN, D. P., SHERMAN, L. & SCHLEGEL, R. 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J Biol Chem*, 272, 13332-7.
- STUBENRAUCH, F. & LAIMINS, L. A. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*, 9, 379-86.
- SUGIYAMA, M., BHAWAL, U. K., KAWAMURA, M., ISHIOKA, Y., SHIGEISHI, H., HIGASHIKAWA, K. & KAMATA, N. 2007. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: Clinical correlates and 5-year survival. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45, 116-122.
- SYRJANEN, S. 2010. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of Oncology*, 21, 243-245.
- SZEKELY, L., SELIVANOVA, G., MAGNUSSON, K. P., KLEIN, G. & WIMAN, K. G. 1993. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5455-9.
- SZKARADKIEWICZ, A., KRUK-ZAGAJEWSKA, A., WAL, M., JOPEK, A., WIERZBICKA, M. & KUCH, A. 2002. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med*, 2, 137-41.
- THIBAUDEAU, E., FORTIN, B., COUTLEE, F., NGUYEN-TAN, P., WENG, X., AUDET, M. L., ABOUD, O., GUERTIN, L., CHRISTOPOULOS, A., TABEL, J. & SOULIERES, D. 2013. HPV Prevalence and Prognostic Value in a Prospective Cohort of 255 Patients with Locally Advanced HNSCC: A Single-Centre Experience. *Int J Otolaryngol*, 2013, 437815.
- THOMPSON, M. P. & KURZROCK, R. 2004a. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 803-21.
- THOMPSON, M. P. & KURZROCK, R. 2004b. Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical Cancer Research*, 10, 803-821.

- THORLAND, E. C., MYERS, S. L., GOSTOUT, B. S. & SMITH, D. I. 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22, 1225-37.
- VELDMAN, T., HORIKAWA, I., BARRETT, J. C. & SCHLEGEL, R. 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 75, 4467-72.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1992. p53 function and dysfunction. *Cell*, 70, 523-526.
- VOUSDEN, K. H. & FARRELL, P. J. 1994. Viruses and human cancer. *Br Med Bull*, 50, 560-81.
- WENSING, B. & FARRELL, P. J. 2000. Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes and Infection*, 2, 77-84.
- WITKIN, S. S., GERBER, S. & LEDGER, W. J. 2002. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis*, 34, 204-9.
- XU, B., CHOTEWUTMONTRI, S., WOLF, S., KLOS, U., SCHMITZ, M., DURST, M. & SCHWARZ, E. 2013. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One*, 8, e66693.
- YOUNG, L. S., DAWSON, C. W., BROWN, K. W. & RICKINSON, A. B. 1989. Identification of a Human Epithelial-Cell Surface Protein Sharing an Epitope with the C3d/Epstein-Barr Virus Receptor Molecule of B Lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 43, 786-794.
- YOUNG, L. S. & MURRAY, P. G. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22, 5108-21.
- YU, T., FERBER, M. J., CHEUNG, T. H., CHUNG, T. K., WONG, Y. F. & SMITH, D. I. 2005. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 158, 27-34.
- ZUR HAUSEN, H. 1999. Viruses in human cancers. *European Journal of Cancer*, 35, 1878-85.
- ZUR HAUSEN, H. 2001. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene*, 20, 7820-3.

VII. ANEXO 1

Tabela 6: Primers e sonda PCR e PCR em tempo real.

	Nome	Sequência
Ciclina	Forward	5'-GTG AAG TTC ATT TCC AAT CCG C-3'
	Reverse	5'-GGG ACA TCA CCC TCA CTT AC-3'
HPV MY 09/11*	MY09	5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'
	MY11	5'GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'
HPV GP5+/6+	GP5+	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'
	GP6+	5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT-3'
HPV 16	E6 Forward	5'-AAA GCC ACT GTG TCC TGA-3'
	E6 Reverse	5'-CTG GGT TTC TCT ACG TGT TTC-3'
HPV 18	Forward	5'-CGT CGT TGG AGT CGT TCC TG-3'
	Reverse	5'-ACC TTA ATG AAA AAC CAC GA-3'
HPV 11	Forward	5'-GGA ATA CAT GCG CCA TGT GG-3'
	Reverse	5'-CGA GCA GAC GTC CGT CCT CG-3'
HPV 6	Forward	5'-TAG TGG GCC TAT GGC TCG TC-3'
	Reverse	5'-TCC ATT AGC CTC CAC GGG TG-3'
EBV POL	Forward	5'-CTT TGG CGC GGA TCC TC-3'
	Reverse	5'-AGT CCT TCT TGG CTA GTC TGT TGA C-3'
	Sonda TaqMan	FAM-CAT CAA GAA GCT GCT GGC GGC C –TAMRA

*Primers degenerados