



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA**

LUÍS FILIPE BORTOLOTTO UGALDE

**ASSOCIAÇÃO DA POSITIVIDADE DE HPV E PROTEÍNA P16 EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

**PASSO FUNDO - RS
2021**

LUÍS FILIPE BORTOLOTTU UGALDE

**ASSOCIAÇÃO DA POSITIVIDADE DE HPV E PROTEÍNA P16 EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação
apresentado como requisito parcial para a obtenção do
título de Médico da Universidade Federal da Fronteira
Sul, campus Passo Fundo, RS.

Orientadora: Prof.^a MSc. Daniela Augustin Silveira

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Jossimara Polettini

Coorientador: Dr. André Roberto Mozzini

PASSO FUNDO – RS

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Ugalde, Luís Filipe Bortolotto Correlação de HPV e proteína
P16 em amostras de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e
Pescoço / Luís Filipe Bortolotto Ugalde. -2021.
62 f.

Orientador: Mestre Daniela Silveira Augustin.

Coorientador: Doutora Jossimara Poletini, Especialista André
Roberto Mozzini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Universidade Federal da
Fronteira Sul, Curso de Medicina, Passo Fundo, RS , 2021.

1. Papiloma Vírus Humano (HPV). 2. Câncer da Cavidade
Oral. 3. Câncer Orofaríngeo. I. Augustin, Daniela Silveira,
orient. II. Poletini, Jossimara, co-orient. III. Mozzini, André
Roberto.
IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

LUÍS FILIPE BORTOLOTTO UGALDE

**ASSOCIAÇÃO DA POSITIVIDADE DE HPV E PROTEÍNA P16 EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação
apresentado como requisito parcial para a obtenção do
título de Médico da Universidade Federal da Fronteira
Sul, campus Passo Fundo, RS.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi defendido e aprovado pela banca em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profª. MSc. Daniela Augustin Silveira

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti

Prof. MSc. Lieverson Augusto Guerra

RESUMO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) é composto de projeto de pesquisa, relatório e artigo científico, cuja elaboração foi baseada no Manual de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e no Regulamento do TCC do Curso de Medicina Campus Passo Fundo, em que se apresenta o resultado da análise de amostras de câncer de cabeça e pescoço de pacientes cuja investigação anatomopatológica foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo – RS. O presente estudo foi produzido pelo acadêmico Luís Filipe Bortolotto Ugalde, orientado pela Professora MSc. Daniela Augustin Silveira e coorientado pela Professora Dr^a Jossimara Polettini, ao longo do 5^o, 6^o e 7^o semestres do curso, respectivamente nos Componentes Curriculares de Pesquisa em Saúde, TCC I e TCC II. Objetivou-se verificar a presença do Papilomavírus Humano (HPV) no processo de carcinogênese de cavidade oral e orofaringe a fim de caracterizar a população estudada frente a este agente cuja descrição na literatura científica é recente, sobretudo perante a associação com a expressão da proteína p16 previamente descrita nestas amostras. Assim, pretende-se contribuir na determinação do perfil dos pacientes acometidos com estas neoplasias na região de Passo Fundo - RS.

Palavras chave: Papilomavírus humano; Reação da cadeia polimerase; Neoplasias de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

This Undergraduate Final Work is composed of a research project, report and scientific article, which were designed based on the Academic Works Manual of the Federal University of Fronteira Sul (UFFS) as well as on the Undergraduate Final Work Regulation from the undergraduate course of Medicine, campus Passo Fundo-RS. Such work showcases the analysis results of head and neck cancer samples from patients whose anatomopathological investigation was performed at the Laboratory of Pathology from the São Vicente de Paulo Hospital, in Passo Fundo - RS. The present study was developed by the undergraduate student Luís Filipe Bortolotto Ugalde, under orientation of Professor MSc. Daniela Augustin Silveira and co-orientation of Professor Dr^a Jossimara Poletini, throughout the 5th, 6th and 7th semesters of the course, respectively in the Curricular components of Pesquisa em Saúde, TCC I and TCC II. This study aimed to verify the presence of Human Papillomavirus (HPV) in the carcinogenesis process of the oral cavity and oropharynx in order to characterize the studied population as to this agent whose description in the scientific literature is quite recent, particularly considering the association with p16 protein expression previously described in these samples. Thus, contributing to determine the profile of patients affected by these neoplasms in the Passo Fundo - RS area.

Keywords: Human papillomavirus; Polymerase chain reaction; Head and Neck Neoplasms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	DESENVOLVIMENTO	9
2.1	PROJETO DE PESQUISA.....	9
2.1.1	Resumo	9
2.1.2	Tema	9
2.1.3	Problema	10
2.1.4	Hipóteses	10
2.1.5	Objetivos	10
2.1.5.1	Objetivo geral	10
2.1.5.2	Objetivos específicos	11
2.1.6	Justificativa	11
2.1.7	Referencial teórico	11
2.1.8	Metodologia	17
2.1.8.1	Tipo de estudo	17
2.1.8.2	Local e período de realização	17
2.1.8.3	População e amostragem	18
2.1.8.4	Variáveis e coleta de dados	18
2.1.8.5	Processamento, controle de qualidade e análise dos dados	21
2.1.8.6	Aspectos éticos	21
2.1.9	Recursos	22
2.1.10	Cronograma	22
2.1.11	Referências	23
2.1.12	Apêndices	
	APÊNDICE A: FICHA DE COLETA DE DADOS.....	30
2.2	Relatório de pesquisa	31
2.2.1	Anexos	34
	ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	34
	ANEXO B: PARECER CONSUBSTANCIANDO DO CEP EMENDA	35
	ANEXO C: NORMAS REVISTA.....	37
3.	ARTIGO CIENTÍFICO	43
	Referências	59

1. INTRODUÇÃO

Inseridas em um contexto de mudança global que acarreta em fenômenos como envelhecimento populacional, mudança no perfil de mortalidade, queda na incidência de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas, o câncer ganha destaque, representando 21% das causas de morte por doenças e agravos não transmissíveis nos últimos anos (ALBALA; VIO; YANEZ, 1997; GUERRA; MOURA GALLO; MENDONÇA, 2005; INCA, 2018). No Brasil é estimado que, durante o biênio 2018-2019, ocorram 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2003), em relação aos sítios anatômicos acometidos pelo câncer de cabeça e pescoço, os mais frequentes compreendem a neoplasias situadas na cavidade oral e orofaringe, somando cerca de 390 mil novos casos por ano no mundo. Em relação ao Brasil, estima-se que o câncer de cavidade oral e orofaringe será responsável por 11.200 novos casos em homens e 3.500 em mulheres durante o biênio 2018-2019 (INCA, 2018).

Em relação ao tipo histológico dos cânceres de cavidade oral e orofaringe, 90% são carcinomas de células escamosas (ALVARENGA et al., 2008; DEDIVITIS et al., 2004). A patogenia dessa neoplasia é multifatorial, tendo sido elucidados como importantes fatores de risco o álcool e tabagismo, sendo que um indivíduo que fume um maço de cigarros por dia tenha 15 vezes mais risco de desenvolver câncer de cavidade oral em relação a um não tabagista, bem como o sinergismo destes fatores de risco amplifica o potencial carcinogênico (FIGUEIRO RUIZ, 2003; SOUZA; SAKAE; GUEDES, 2008) . Além destes, a infecção pelo Papiloma vírus humano (HPV) tem sido diretamente relacionada com a etiologia de carcinomas de células escamosas na cavidade oral e orofaringe (LEEMANS et al., 2011; PAN; ISSAEVA; YARBROUGH, 2018).

Sabe-se que a carcinogênese está relacionada com alteração na maquinaria celular, cuja consequência culmina com falha na expressão de proteínas envolvidas nos comandos de inibição do ciclo celular (ROBBINS, 2010; FERRARO, 2011). A técnica de imuno-histoquímica propicia a detecção destas proteínas a nível celular, tendo destaque a disfunção da proteína p16 no ciclo

celular e sua relação com a infecção com o HPV (BRITTO, 2014; SPENCE, 2016).

Em relação à atividade das proteínas no ciclo celular, sabe-se que a proteína retinoblastoma (RB) exerce regulação por meio da inibição da proteína p16 e a consequente frenagem da iniciação do ciclo (ROBBINS, 2010). Além disso, quando a proteína RB está inativa, torna-se fixa ao fator de transcrição E2F, o qual exerce efeito antiproliferativo – bem como, quando a proteína RB está ativa, permite a liberação deste fator de transcrição e o consequente início da mitose (BEHAR, 2008; ROBBINS, 2010). Dessa forma, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV atuam sobre esta regulação da maquinaria celular (BRITTO, 2014). De forma mais específica, a proteína E7 impede a ação da proteína RB, acarretando na liberação do fator de transcrição E2F de forma desenfreada (MANNARRINI, 2009). Logo, ocorre proliferação celular de modo desregulado e perda da inibição da proteína p16, acarretando em superexpressão desta última e justificando seu uso como biomarcador (SPENCE, 2016).

Nesse sentido, têm-se utilizado recentemente, associada à técnica de imuno-histoquímica – cujo resultado permite a detecção de proteínas do ciclo celular anômalas – a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), confirmando a relação do vírus com tais alterações de expressão proteica (BISHOP et al., 2015). Em artigo de revisão sistemática realizado no ano de 2015, no estado de São Paulo, os autores detectaram a presença do HPV em 27,4% das amostras de carcinoma de células escamosas, em comparação com 6,2% de indivíduos saudáveis (CERNEA; MATOS; MIRANDA, 2015). Sabe-se também que a associação entre a presença do DNA-HPV e a expressão imuno-histoquímica da proteína p16 têm mostrado resultados conflitantes, como, por exemplo, pode-se observar no estudo realizado por Cantarutti et al o qual não evidenciou esta associação em comparação com o trabalho desenvolvido por Fragonesi et al, em que foi constatada a associação de 50% (CANTARUTTI et al., 2014; FRAGONESI et al., 2003).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é determinar a positividade de subtipos de HPV, pela técnica da PCR, em casos de carcinomas de células escamosas da cavidade oral e orofaringe. Ademais, visa relacionar o perfil

sociodemográfico dos pacientes e a positividade imuno-histoquímica para a proteína p16 com os resultados obtidos na análise por PCR.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. PROJETO DE PESQUISA

2.1.1. Resumo

O estudo visa verificar a presença do Papilomavirus Humano (HPV) no processo de carcinogênese de cavidade oral e orofaringe, uma vez que, além do tabagismo e etilismo, condições bem estabelecidas para o desenvolvimento dessas neoplasias, têm-se relacionado nos últimos anos a infecção por esse vírus como participante, também, destas neoplasias. Atualmente, são reconhecidas, mediante técnicas imuno-histoquímicas, falhas na expressão de proteínas mediadoras do ciclo celular, como p53, pRB e a p16. Dessa forma, será verificada a presença do DNA viral através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de pacientes que realizaram procedimento cirúrgico por câncer de cavidade oral e orofaringe, no período de 2010 a 2016, cujo exame anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, e previamente analisadas por técnica imuno-histoquímica quanto à expressão da proteína p16. Espera-se encontrar positividade de HPV nas amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe, assim como associação positiva com proteína p16.

Palavras chave: Papiloma Vírus Humano. Reação em Cadeia da Polimerase. Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe.

2.1.2. Tema

Relação de neoplasias de cavidade oral e orofaringe com a infecção viral por HPV e expressão da proteína p16.

2.1.3. Problema

Qual a prevalência da presença do HPV nas amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe?

Qual a porcentagem de amostras com proteína p16 positiva que irão apresentar positividade do DNA-HPV?

Quais são os tipos virais de HPV mais prevalentes nas amostras coletadas?

Qual a associação da expressão da reação imuno-histoquímica para proteína p16 e a presença de HPV?

Qual sexo, faixa etária, extensão tumoral (TNM – estadiamento do câncer de orofaringe e cavidade oral), origem (Sistema Único de Saúde – SUS – ou Privado) e hábitos de vida (tabagismo e etilismo) dos pacientes que apresentam positividade de HPV em carcinomas de células escamosas em orofaringe?

2.1.4. Hipóteses

A prevalência de infecção por HPV estará entre 60-90% nas amostras de carcinoma de células escamosas.

Aproximadamente 80% das amostras com a proteína p16 intensamente positiva irão apresentar positividade do genoma viral HPV.

Os subtipos virais mais prevalentes serão os de alto risco (HPV 16 e 18).

Existe associação positiva entre a reação imuno-histoquímica para proteína p16 e a presença de HPV.

A positividade de HPV em carcinomas de células escamosas será mais frequente em homens, 90% originados do SUS, com média de idade de 60 anos, com tumores menos agressivos e estará relacionado com etilismo e tabagismo.

2.1.5. Objetivos

2.1.5.1. Objetivo Geral

Estimar a prevalência de infecção por HPV nas amostras de carcinoma de células escamosas da orofaringe e cavidade oral e sua associação com a positividade reação imuno-histoquímica para proteína p16.

2.1.5.2. Objetivos Específicos

Avaliar os principais subtipos virais de HPV presentes nas amostras.

Verificar a associação da presença do vírus HPV com a intensidade da reação imuno-histoquímica para proteína p16.

Determinar sexo, faixa etária, extensão tumoral, origem do atendimento e hábitos de vida mais frequentes entre os pacientes que apresentam positividade de HPV em carcinomas de células escamosas em orofaringe.

2.1.6. Justificativa

Estudos atuais sugerem que o HPV possui grande relevância no processo de carcinogênese de cavidade oral e, principalmente, orofaringe. Sabe-se que o número de cânceres relacionados ao tabagismo reduziu juntamente com as campanhas que visam a diminuição desta prática, incluindo neoplasias de cavidade oral e laringe. Ainda assim, o número de cânceres de orofaringe aumentou, conjuntamente com conhecimento do papel etiológico do HPV.

Ademais, recentemente, tem sido explorado na literatura sobre a forte correlação entre positividade imuno-histoquímica intensa para proteína p16 e a presença do HPV, chegando a valores entre 60-100% de coexistência.

Frente a esta situação, será possível detectar a prevalência de HPV e os subtipos virais de maior frequência nas amostras de neoplasias de cavidade oral e orofaringe, bem como relacionar sua presença com a expressão de proteína p16, propiciando a adoção de medidas de prevenção e rastreamento mais precisas a partir de uma pesquisa com dados regionais.

2.1.7. Referencial teórico

2.1.7.1 Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço

Câncer de cabeça e pescoço é um termo utilizado para referenciar um grupo de neoplasias situadas em trato aerodigestivo superior, incluindo cavidade oral, faringe e laringe. Estas mesmas estruturas podem ser agrupadas em câncer oral (lábios, base da língua, língua, assoalho bucal e palato duro) e faringe (orofaringe, hipofaringe e a nasofaringe) (ALVARENGA et al., 2008; DOBROSSY, 2005). Cerca de 90% dos casos são representados pelo tipo histológico de carcinoma de células escamosas, cuja letalidade é responsável pela sexta maior causa de morte por neoplasia maligna no Brasil (CASATI et al., 2012; ANTUNES et al., 2001). Ademais, são estimados 633.000 novos casos por ano e 355.000 mortes em todo o mundo (CHATURVEDI, 2012).

A etiologia do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é notadamente multifatorial, resultando da complexa interação entre fatores endógenos, fatores exógenos ambientais e relacionado ao comportamento do indivíduo, sendo muito bem delimitado na literatura o potencial carcinogênico do álcool e tabaco nessas neoplasias (BIAZEVIC et al., 2006 ; MAHBOUBI; SAYED, 1996; HAMADA et al., 1991). Dentro desse contexto, foram estimuladas intensas campanhas contra o tabagismo e alcoolismo, permitindo a proeminência, nos últimos anos, de outro fator de risco: o Papilomavirus Humano (HPV) (QUINTERO et al., 2013; TERMINE et al., 2008). Uma vez que o mesmo corresponde a uma infecção sexualmente transmissível, são elencados como comportamento de risco para contaminação da cavidade oral e orofaringe com o vírus aspectos como: número elevado de parceiros sexuais, prática de sexo oral desprotegido e iniciação precoce de atividade sexual (OLIVEIRA et al., 2008). Estudos recentes sugerem que o HPV16 é o genótipo mais prevalente e, por conseguinte, relevante dentre as características epidemiológicas destes carcinomas (AGUIAR et al., 2014; LIM et al., 2007; KLETER et al., 1998)

Sabe-se que a incidência do carcinoma de células escamosas orofaríngeo aumenta com a idade, acometendo de forma preponderante a partir da quarta e quinta décadas de vida (MAHBOUBI; SAYED, 1996). Em um estudo realizado na Europa foi constatado que 98% dos pacientes têm mais de 40 anos, além de que 75% dos casos de câncer de cavidade oral são diagnosticados na faixa etária dos 60 anos (CARVALHO et al., 2001; DOBROSSY, 2005)

O tratamento do carcinoma de células escamosas da cavidade oral e orofaringe é geralmente realizado através de cirurgia, seguida de radioterapia,

podendo incluir quimioterapia para aumentar as chances de cura (PANNONE et al., 2011).

2.1.7.2 Infecção por HPV

O papiloma vírus humano é responsável pela principal causa de infecção viral do trato genital, bem como ocupa importante papel nas causas de doenças sexualmente transmissíveis (BURD, 2003). Sua transmissão, ainda que seja considerada uma infecção sexualmente transmissível, ocorre mesmo sem relação sexual de penetração vaginal ou anal, uma vez que o contágio se dá pelo contato com pele ou mucosa infectada (OKUNADE, 2019). Dessa forma, aproximadamente 70% dos homens e mulheres ativos sexualmente irão ser contaminados, porém, sua resolução ocorre em alguns meses, acarretando em 90% de cura em até 2 anos (GLOBOCAN, 2012; OKUNADE, 2019).

Nesse sentido, têm-se elencado fatores de risco para o contágio, como múltiplos parceiros sexuais, não adesão ao uso de camisinha, relações sexuais não monogâmicas e histórico de infecção prévia (CHELIMO et al., 2013). Adolescentes sexualmente ativos e mulheres jovens possuem maior risco de infecção em relação a mulheres e homens acima dos 25 anos, sendo esse fato produto da interação entre fatores comportamentais, biológicos e culturais (DUNNE et al., 2007; MATKINS, 2013)

Existem mais de 200 tipos de HPV reconhecidos por meio na sequência de DNA, sendo a maior parte inofensiva do ponto de vista de complicações e apresentando característica de infecção epiteliotrófica (ELREGAEY, 2014; OKUNADE, 2019). Desse modo, seu contágio está relacionado a uma variedade de condições clínicas que permeiam lesões inócuas até câncer, porém, a maior parte das afecções são benignas e apenas algumas persistem e evoluem para lesões malignas localizadas em orofaringe, região cervical, vulva, vagina e pênis (BURD, 2003; OKUNADE, 2019). Sua relevância perante à carcinogênese fica evidente, por exemplo, em relação ao câncer cervical – cuja patogenia pelo HPV representa quase a totalidade dos casos – em que ocupa o terceiro lugar entre os cânceres mais comuns entre mulheres, somando aproximadamente 569,847 casos diagnosticados (BRUNI L. et al., 2019)

Ainda que os cânceres de células escamosas de cabeça e pescoço apresentem variada etiologia – tabagismo, alcoolismo – sabe-se que o aumento

do câncer de orofaringe tem sido atribuído à infecção pelo HPV (CHATURVEDI, A.K. et al., 2013; CHATURVEDI et al., 2008; GILSON, M.L. et al., 2008). Na América do Norte e Europa, aproximadamente 70-80% dos casos de carcinomas de células escamosas de orofaringe tem sido relacionados ao HPV, principalmente ao subtipo 16 e, em menor quantidade, aos subtipos 18, 31 e 33 (ANTHONY et al., 2013; CHATURVEDI et al., 2011).

2.7.1.3 Patogenia da infecção por HPV

A infecção pelo vírus pode envolver a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, mais relacionada ao desenvolvimento de neoplasias, ou à forma epissomal, em que não ocorre integração e está mais relacionada a alterações benignas (ROBBINS, 2010; FERRARO, 2011). Ao infectar a mucosa ou o tecido epitelial, ocorre replicação viral nas camadas mais basais, porém, nem sempre de forma imediata: o vírus pode permanecer latente ou continuar a replicação ao ponto de surgirem alterações histológicas e citológicas (FERNANDES; ARAÚJO; MEDEIROS, 2013).

Os subtipos de baixo risco – HPV 6 e HPV 11 – são atribuídos a lesões benignas, como papilomas de células escamosas, enquanto aqueles considerados de alto risco – representados principalmente pelo HPV 16 e 18 – estão relacionados à carcinogênese e são, portanto, considerados oncogênicos (MUNGER et al., 2004 ; YAKIN et al., 2019). Tal evidência é sustentada por diversos trabalhos, sendo o subtipo HPV 16 classificado pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como fator de risco no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas oral e de orofaringe (COGLIANO et al., 2010; IARC, 2019). Por outro lado, o subtipo HPV 18 é classificado pela IARC como fator de risco com evidência limitada para carcinomas na cavidade oral em humanos, devido à falta de evidências para embasar seu papel nessa patogenia até o momento (IARC, 2019).

O HPV está classificado na família Papillomaviridae, gênero Papilomavírus, sendo constituído de estrutura não-envelopada (NEVES et al., 2002; MOROIANU; NELSON; ROSE, 2002; RIVOIRE et al., 2001). Possui um genoma de DNA de fita dupla circular, cuja constituição é formada por, aproximadamente, 6.800 a 8.400 pares de bases (NEVES et al., 2002; MOROIANU; NELSON; ROSE, 2002). Tal estrutura genômica é formada por seis

genes com expressão precoce e outros dois que possuem expressão tardia, sendo denominados respectivamente de E (Early) e L (Late) (LAIMINS; FEHRMANN, 2003; ROSENSTIERNE, 2003), como exemplificado na imagem:

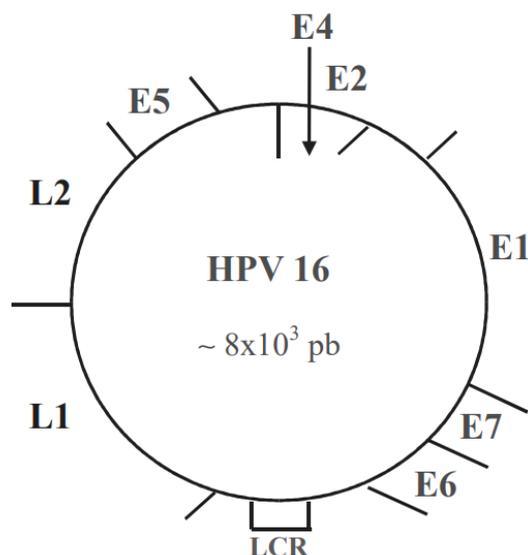


FIGURA 1 – Estrutura genômica do vírus HPV

Fonte: CRUZ; FALHARI; SOUTO, 2005

A região E é constituída pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (CRUZ; FALHARI; SOUTO, 2005). Cada gene possui uma função específica, sendo assim, E1 está relacionado com replicação viral, E2 com replicação e transcrição, E4 com a maturação da estrutura viral e alteração da matriz intracelular, enquanto os últimos três – E5, E6 e E7 – estão envolvidos na transformação celular (BURD, 2003; LAIMINS; FEHRMANN, 2003; LEE et al., 2000). A região L, por sua vez, é formada pelos genes L1 e L2, cuja função é a codificação de proteínas do capsídeo (CRUZ; FALHARI; SOUTO, 2005).

As principais proteínas relacionadas à transformação do epitélio provocada pelo HPV são E6 e E7 (BECHTOLD; BEARD; RAJ, 2003). A proteína E6 de alto risco oncogênico tem a capacidade de associar-se a proteína p53 da célula hospedeira, formando um complexo que resulta na ubiquitinação da mesma com a consequente degradação (CRUZ; FALHARI; SOUTO, 2005). Além da função da repressão de p53, E6 também tem como função a atividade de telomerase, contribuindo para imortalização da célula (KISSELJOV, 2000; SCULLY, 2002).

A proteína E7, por sua vez, tem como principal função desregular a maquinaria do ciclo celular através da interação com proteínas responsáveis pela regulação e ativação de genes celulares (KISSELJOV, 2000). Um destes mecanismos é através da ligação a proteína RB e o deslocamento dos fatores de transcrição de E2F que são, em situação normal, sequestrados por RB. Essa interação acarreta na ativação de fatores transcricionais e na progressão do ciclo celular (KISSELJOV, 2000; CRUZ; FALHARI; SOUTO, 2005). Outra função da proteína RB, que é perdida pela inativação promovida por E7, é a inibição da transcrição da proteína p16 (SANO et al., 1998; KLAES et al., 2001). Como consequência, ocorre acúmulo de p16 que pode ser verificada através de técnicas de imuno-histoquímica (O'NEILL; MCCLUGAGGE, 2006).

2.7.1.4 Técnica Imuno-histoquímica e p16

O câncer orofaríngeo de células escamosas com positividade para HPV de alto risco aumentou nas últimas décadas e foi associado ao melhor prognóstico em relação àqueles que são negativos para o vírus, uma vez que respondem melhor a radioterapia e algumas formas de quimioterapia (GILLISON et al., 2015; ANG et al., 2010). Nesse contexto, levando em consideração que pacientes com câncer de células escamosas de cabeça e pescoço – bem como de cérvix uterina – e com infecção por HPV de alto risco apresentam superexpressão da proteína p16, esta é utilizada de forma ampla como marcador para estes casos de câncer (CHUNG et al., 2014; PATIL et al., 2014; SINGHI.; WESTRA, 2010; STEPHEN et al., 2013). Dessa forma, sabe-se que a atividade de transcrição do DNA, cuja detecção fornece relevância biológica da atividade do vírus, pode ser verificada por meio da imuno-histoquímica para proteína p16 (ANG et al., 2010; LEWIS et al., 2010; UKPO et al., 2011).

Esse rastreio permite que o paciente seja classificado em uma estratificação de risco e orienta o acompanhamento do mesmo, bem como possibilita o estabelecimento de tratamento adequado de acordo com a característica biológica do tumor e identifica a tendência epidemiológica (LEWIS; JAMES, 2012). Muitos defendem que a técnica imuno-histoquímica para p16 seja, caso apresente resultado positivo, complementada por outro teste específico para HPV, como a detecção do DNA por Hibridização In Situ ou

técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), visando um rastreio mais preciso (ROBINSON et al., 2010; SCHACHE et al., 2011; SINGHI; WESTRA, 2010; SLOAN; SHAW, 2010; THAVARAJ et al., 2011).

Ainda assim, a literatura demonstra que o uso de p16 fornece sensibilidade suficiente para ser utilizado como biomarcador, com alta correlação entre imuno-histoquímica para proteína p16 e testes específicos para HPV (Hibridização In Situ e PCR) (SCHACHE et al., 2011; UKPO et al., 2011). Por exemplo, Robinson e colaboradores, em 2010, demonstraram, através de uma análise agrupada, que em 496 pacientes oriundos de diversos estudos, apenas 8% dos casos eram p16 negativo/ HPV positivo e 5% eram p16 positivo/ HPV negativo (ROBINSON et al., 2010).

Tendo em vista a patogenia do HPV relacionada ao câncer de cabeça e pescoço e à expressão de p16, a oitava edição TNM 2017 dividiu em dois grupos o estadiamento dos tumores de orofaringe, HPV positivo e negativo, além da mudança em T para a cavidade oral (LYDIATT, 2017). Dessa forma, o conhecimento da positividade viral em populações específicas promove melhoria do acompanhamento dos pacientes.

2.1.8 Metodologia

2.1.8.1 Tipo de Estudo

Estudo quantitativo observacional, do tipo transversal descritivo e analítico.

2.1.8.2 Local e período de realização

Tendo em vista os dados prévios coletados da expressão da proteína p16 pela acadêmica Ana Claudia de Alcântara Amaro, discente Graduação em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus de Passo Fundo, sob orientação da Professora Ms. Daniela Augustin Silveira, torna-se possível, agora, associar estes achados com a presença do genótipo viral do HPV – informação que será coletada através da pesquisa pela técnica PCR – a

partir de dados locais, agregando informações acerca desta associação à literatura científica.

A pesquisa do genótipo viral será realizada no Hospital São Vicente de Paulo e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul na cidade de Passo Fundo -RS. A realização acontecerá no período de janeiro de 2020 a dezembro de 2020.

2.1.8.3 População e amostragem

A população do estudo será constituída de pacientes que realizaram procedimento cirúrgico por câncer de cavidade oral e/ou orofaringe. A amostra, formada por 43 pacientes, não probabilista e de conveniência, abrangerá todos aqueles que realizaram procedimento cirúrgico por câncer de cavidade oral e orofaringe, no período de 2010 a 2016, cujo exame anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, com diagnóstico de carcinoma de células escamosas. Estes casos foram avaliados através da reação imuno-histoquímica para proteína p16 em estudo prévio realizado e apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo.

2.1.8.4 Variáveis e coleta de dados

As variáveis serão idade, sexo, etilismo e tabagismo, local de tumor primário, origem do paciente (Sistema Único de Saúde ou Particular), TNM (estadiamento) e reação imuno-histoquímica para proteína p16, dados previamente analisados e apresentados em estudo realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, RS, sob o título de “Câncer de cavidade oral e orofaringe: fatores de risco e expressão da proteína p16”. Adicionalmente, será realizada, nas referidas amostras, o teste molecular de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção e tipagem de HPV.

As variáveis obtidas através da análise das amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe por meio da Reação em Cadeia da Polimerase serão positividade para DNA-HPV e definição de subtipos 6/11, 16 ou 18. A diferenciação entre as variáveis quantitativas dependentes e

independentes está detalhada no item 2.1.8.5 (processamento, controle de qualidade e análise dos dados).

No Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo estão armazenados os blocos de parafina das amostras dos pacientes. Os materiais correspondentes aos pacientes selecionados serão transportados ao Laboratório de Bioquímica da UFFS, no qual ocorrerão as análises de PCR, pelo acadêmico da pesquisa, com auxílio da Dr^a. Jossimara Poletini.

As amostras selecionadas serão submetidas à realização da análise da presença do DNA-HPV e subtipos 6/11, 16 ou 18, através do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As análises serão realizadas no Laboratório de Bioquímica da UFFS, pelo acadêmico da pesquisa, com auxílio da Dra. Jossimara Poletini. As análises serão realizadas nas terças-feiras, quinzenalmente, das 8h30min às 17h.

Os blocos de parafina referentes às amostras das pacientes selecionadas para o estudo serão seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 6 µm de espessura. Os fragmentos serão acondicionados em microtubos estéreis e submetidos à desparafinização em xilol e subsequente extração de DNA total pelo método CTAB/NaCl.

Após desparafinização e acondicionamento dos fragmentos em tampão TET (Tris-EDTA-Tween), será adicionado 50µL de proteinase K em uma concentração final de 400 µg/ul. As amostras serão incubadas a 56°C por 12h para a digestão do material e, após esse período, a proteinase K será inativada por aquecimento a 96°C durante 7 minutos. Em seguida, serão adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C, com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após a incubação será acrescentado 750 µl de clorofórmio – álcool isoamílico 24:1 e centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante será então transferido para novo tubo e adicionado 450 µl de etanol absoluto a – 20°C com posterior incubação por 10 minutos à TA. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante será descartado e 450 µl de etanol 70% será adicionado ao pellet. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o etanol 70% será removido e as amostras serão ressuspensas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR.

Para pesquisa de HPV será empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores MY09 e MY11, que flanqueiam uma região do gene L1 do HPV, e que gera um produto amplificado de 450pb, seguido de Nested-PCR com os primers e GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno de 150pb à região anterior para ampliar a sensibilidade da reação (HUSMAN et al., 1995). Os controles positivos das reações, ou seja, DNA extraído de células HeLa e os clones de cada subtipo analisado, e os respectivos *primers* para as PCRs serão gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Guimarães da Silva, do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A extração do DNA das amostras estudadas será verificada pela amplificação do gene constitutivo da β -globina.

As reações de PCR e Nested-PCR serão realizadas em volume final de 20 μ L, composto por 10 μ L de *Go Taq Green Master Mix 2X* (cód. M 7122-Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6 μ L de cada primer na concentração de 10 μ M; 4,8 μ L de água estéril e 4 μ L de cada amostra pesquisada. As incubações serão realizadas em termociclador com os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e 95°C durante 45 segundos para desnaturação, 47,7°C durante 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Em todas as reações realizadas será utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa.

Para a determinação dos tipos virais presentes nas amostras que apresentaram positividade para DNA de HPV será empregada a técnica de PCR-multiplex. Serão utilizados primers específicos para os tipos 6/11, 16, 18 (VAN DEN BRULE et al., 1990). As reações serão realizadas em volume final de 20 μ L, composto por 10 μ L de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 μ L de cada primer na concentração de 10 μ M; água estéril q.s.p. e 2 μ L de amostra de DNA. Os parâmetros utilizados serão 94°C durante 5 minutos e 94°C durante 1 minuto para desnaturação, 53,5°C durante 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

A eficiência das amplificações será monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados será comparado com o padrão de 100 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta.

2.1.8.5 Processamento, controle de qualidade e análise estatística de dados

Serão obtidos os dados da amostra de pacientes realizada em estudo prévio em nossa instituição, pela discente Ana Cláudia Alcântara, intitulado “Câncer de cavidade oral e orofaringe: fatores de risco e expressão da proteína p16”.

A análise descritiva realizada em estudo prévio contemplou a distribuição de frequência absoluta e relativa e foi executada no programa PSPP versão livre a partir das informações dos prontuários eletrônicos físicos armazenados no arquivo do hospital, bem como a coleta aconteceu no local. As informações coletadas em prontuários foram a identificação do paciente, idade, sexo, se é tabagista e/ou etilista, estadiamento TNM, CID (Classificação Internacional de Doenças) do tumor primário, óbito e data de óbito, ano de diagnóstico e se a origem foi pelo SUS ou particular. Ademais, foi realizada a reação imuno-histoquímica para expressão de proteína p16.

Será realizado com base neste banco de dados inicial a análise da associação entre as variáveis categóricas independentes (idade, sexo, etilismo e tabagismo, local de tumor primário, óbito e data de óbito, ano do diagnóstico, origem (SUS ou Particular), estadiamento TNM) com a variável categórica dependente (detecção do DNA-HPV), verificada por meio do teste Qui-quadrado, empregando-se nível de significância de 5%. Posteriormente, será realizada uma segunda análise, relacionada à associação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína p16, variável categórica independente, com a detecção do DNA-HPV – variável dependente, aplicando-se o teste Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

2.1.8.6 Aspectos éticos

O arquivo biológico, em que estão armazenadas as amostras que serão fonte pesquisa neste trabalho, está sob posse da equipe responsável pelo estudo prévio, realizado pela acadêmica Ana Claudia de Alcântara Amaro sob orientação da Professora Ms. Daniela Augustin Silveira.

Este último foi desenvolvido de acordo com a resolução 466/12 CNS, obtendo aprovação do Comitê do Hospital São Vicente de Paulo e, posteriormente, foi submetido para avaliação ética do Comitê de Ética em Pesquisa da universidade CEP/UFS através da Plataforma Brasil, obtendo aprovação através do parecer número 2.673.402 (Anexo A).

2.1.9 Recursos

Tabela 1 – Recursos

Itens	Quantidade	Custo unitário (R\$)	Custo total (R\$)
Canetas	10	1,00	10,00
Impressões	1000	0,15	150,00
PCR	370	10,00	3700,00
Total			R\$ 3860,00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As despesas descritas acima serão custeadas pela própria equipe de pesquisa. Os equipamentos e o local em que serão realizadas as análises da Reação em Cadeia da Polimerase, por sua vez, são pertencentes à Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

2.1.10 Cronograma

Cronograma para o ano de 2020:

- Revisão de literatura: de Janeiro de 2020 a Novembro de 2020;
- Elaboração do projeto: de Janeiro de 2020 a Março de 2020;
- Coleta de dados: de Março de 2020 a Julho de 2020;
- Processamento de dados: de Julho de 2020 a Setembro de 2020;

- Análise de dados: de Agosto de 2020 a Outubro de 2020;
- Publicação dos dados: de Novembro de 2020 à Dezembro de 2020.

2.1.11 Referências

AGUIAR, M.T.M. et al. Clinicopathological aspects and prevalence of human papillomavirus in anal cancer. **J Coloproctol**, v. 34, p. 76-82, 2014.

ALBALA, C.; VIO, F.; YANEZ, M. Epidemiological transition in Latin America: a comparison of four countries. **Revista Médica de Chile**, Jun. 1997.

ALVARENGA et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 50, p. 68-73, jan./fev., 2018

ANG, KK. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 363, p. 24-35, 2010

ANG, KK. Et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010

ANTUNES, J.L. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncology**, v. 37, n.4, p 345-350, 2001

BECHTOLD, V.; BEARD, P.; RAJ, K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. **J Virol**, v. 77, n. 3, p. 2021-2028, 2003.

BEHAR, M. et al. A expressão da proteína p16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. **Em. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 30, p. 61-66, 2008 .

BISHOP, J.A. et al. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: an update on testing in routine pathology practice. **Semin Diagn Pathol**, v. 32, n.3, p. 44-51, 2015.

BRITTO, N. M. S et al. O papel de p16 e Ki 67 em carcinomas de células escamosas de cavidade oral e orofaringe. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v.43, n. 4, p. 200-205, Dez. 2014.

BRUNI, L. et al. Human Papilloma Virus and Related Diseases in the World- Summary Report, p. 1-316, 2019.

BURD, EM. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 1–17, 2003.

CANTARUTTI et al. Evaluation of Immunohistochemical Expression of p16 and Presence of Human Papillomavirus in Oral and Oropharyngeal Carcinoma. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 25, n. 1, p. 210-214, 2014.

CARVALHO, M. B. et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Em Assoc Med Bras**, v. 47, n. 3, p. 208-14, 2001.

CASATI, M.F.M. et al. Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, v.41, n.4, p 186-191, 2012.

CERNEA, CR.; MATOS, LL.; MIRANDA, GA. Prevalence of oral and oropharyngeal human papillomavirus infection in Brazilian population studies: a systematic review. **Braz. J. otorhinolaryngol**, v. 81, n. 5, p 554-557, 2015.

CHATURVEDI, A.K. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. **Head Neck Pathol**, v. 6, p 16-24, 2012.

CHATURVEDI, AK. Et al. Incidence trends for human papillomavirus-related and-unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J Clin Oncol**, v.26, p. 612-619, 2008.

CHATURVEDI, AK. Et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **J Clin Oncol**, v.31, p. 4550-4559, 2013.

CHATURVEDI, AK. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **J Clin Oncol**, v. 29, n.32, p. 4294-4301, 2019.

CHUNG, CH. Et al. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 32, p. 3930-3938, 2014.

COGLIANO, VJ. Et al. Preventable exposures associated with human cancers. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, p. 1827–1839, 2010

DEDVITIS RA et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.70, p. 35-40, 2004.

DOBROSSY, I. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Em**, v. 24, p. 9-17, 2005.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201-5207, 2003.

FERNANDES, JV.; de ARAÚJO, JMG; MEDEIROS FERNANDES, TAA. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **Open Access Journal of Clinical Trials**, v. 5, p. 1-12, 2013.

FERRARO, et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, nº 4, p. 451-459, 2011.

FRAGONESI et al. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human 25avidade25e25us. **The jornal of histochemistry and cytochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1291 – 1297, 2003.

GILSON, ML. et al. : Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16–positive and human papillomavirus type 16–negative head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**, v.100, p. 407-420, 2008.

GILSON, et al. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 33, p. 3235 – 3235, 2015.

GLOBOCAN. Cervical cancer: estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. **International Agency for Research on Cancer**. Lyon, France, 2012.

GUERRA, Maximiliano Ribeiro; GALLO, Cláudia Vitória de Moura; MENDONÇA, Gulnar Azevedo e Silva. Risco de Câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.51, n.3, p.227-234, 2005

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **25avidad Classifications by 25avida sites with 25avidade25e or limited evidence in humans**. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2012. Rio de Janeiro, 2011.

KISSELJOV, FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and 26avidade 26avidad. *Biochemistry*, v. 65, n.1, p. 68-77, 2000

KLAES, R. et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, v. 92, p. 276-284, 2001

KLETER, B. et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*, v. 153, p. 1-9, 1998.

LEE, D. et al. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2 dependent transcription. *J Biol Chem*, v. 275, n. 10, 7045-7051, 2000.

LEEMANS, C.R. et al. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews*, v. 11, p. 9-22, 2010

LEWIS, JS. Et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*, v. 34, n. 8, p. 1088-1096, 2010

LIM, K.P. et al. HPV infection and the alterations of the pRB pathway in oral carcinogenesis. *Oncol Rep*, v. 17, p. 1-6, 2007

LIN, BY. Et al. Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol*, v. 22, n. 18, p. 6592-6604, 2002

LYDIATT, W.M. et al. Head and Neck cancers – major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *A Cancer Journal for Clinicians*. Jan. 2017.

MAHBOUBI, E.; SAYED, G.M. Oral cavity and pharynx. *Cancer Epidemiology and prevention*, Nova Iorque, p. 583-595, 1996

MANNARRINI, L. et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta otorhinolaryngologica itálica*, v. 29, p. 119-126, 2009;
MUNGER, K. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, v. 78, p. 11451–11460, 2004

NELSON, LM. Et al. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*, v. 277, n. 26, p. 23958-23964, 2002.

NEVES, D. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. **Braz J Urol**, v. 28, n. 3, p. 221-226, 2002

NICHOLS, AC. Et al. Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer? **J of Otolaryngol – Head & Neck Surg**, v.42, p. 1-9,2013.

OLIVEIRA, L.R. et al. HPV infection in Brazilian oral squamous cell carcinoma patients and its correlation with clinicopathological outcomes. **Mol Med Rep**, v. 1, n. 12, p. 3-9, 2008

PAN, C.; ISSAEVA, N.; YARBROUGH, W.G. HPV-driven oropharyngeal cancer: current knowledge of molecular biology and mechanisms of carcinogenesis. **Cancer of Head & Neck**, v., 2018

PANNONE, G. et al. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. **Infect Agent Cancer**, v.6. n.4, 2011.

PATIL, S. et al. Analysis of human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma using p16: An immunohistochemical study. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 4, p. 61-66, 2014.

QUINTERO, K. et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.79, n. 3, p 75-81, 2013.

RAFAEL, S.; FALHARI, JPB.; CRUZ, AD. O papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

RIVOEIRE, AW. et al. Bases biomoleculares da oncôgenese cervical. **Rev Bras Cancerol**, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

ROBBINS, Stanley L. et al. Patologia: bases patológicas das doenças. 9. Ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2010.

ROBINSON, M.; SLOAN, P.; SHAW, R. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. **Oral Oncol**, v. 46, n. 7, p. 492-496, 2010.

ROSENSTIERNE, MW et al. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. **J Gen Virol**, v. 84, p. 2909-2920, 2003.

RUIZ, E.F. et al. Efectos del consumo de alcohol etílico em la 27avidade oral: Relación com el câncer oral. **Med Oral**, v. 9, p. 14-23, 2014.

SANO, T. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am J Pathol**, v. 153, p. 1741-1748, 1998.

SCHACE, AG. Et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. **Clin Cancer Res**, v. 17, n.19, p. 6262-6271, 2011.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncol**, v. 38, p. 227-234, 2002.

SINGHI, AD.; WESTRA, WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. **Cancer**, v. 116, v. 9, p. 2166-2173, 2010.

SNOW, NJ et al. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cells carcinomas. **Adv Anat Pathol**, v. 17, p. 394-403, 2010.

SOUZA, R.M.; SAKAE T.M.; GUEDES A.L. Características clínico-epidemiológicas de pacientes portadores de carcinomas da cavidade oral e orofaringe em clínica privada no sul do Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.37, n.2, p. 32-41, 2008.

SPENCE, Tara et al. HPV Associated Head and Neck Cancer. **Cancers**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.75-87, 5 ago. 2016.

STEPHEN, JK. Et al. Significance of p16 in site-specific HPV positive and HPV negative head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Clin Oncol**, v. 2, p. 51-61, 2013.

STEWART, BW; KLEIHUES, P. World cancer report. **Lyon: IARC Press**, 2003
TERMINE, N. et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). **Ann Oncol**, v. 19, p 81-90, 2008.

THAVARAJ, S. et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 4, p. 308-312, 2011.

UKPO, OC. Et al. High risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and

patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 35, p. 1343-13450, 2011.

YAKIN, M. et al. Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the Essentials. **Australian Dental Journal**, v. 64, p. 11-18, 2019.

2.1.12 Apêndices

APÊNDICE A - FICHA DE COLETA DE DADOS

Número do formulário	
FICHA DE COLETA DE DADOS	
1. Sexo	SEX
2. Idade na entrada do serviço:	IDA
3. Histórico de Tabagismo: (1) Nunca (2) Ex-consumidor (3) Tabagista	TAB
4. Histórico de consumo de bebida alcoólica: (1) Nunca (2) Ex-consumidor (3) Sim	ALCOOL
5. Local do tumor primário: (1) Cavidade Oral (2) Orofaringe	LOCALTU
6. Óbito por câncer: (1) Sim (2) Não	OBITO
7. Tempo de evolução para óbito: (1) < 6 meses (2) 6-12 meses (3) > 12 meses	EVOL
8. Origem do Encaminhamento: (1) SUS (2) Não SUS	ORI
9. Estadiamento: (1) (2) (3) (4)	ESTAD
10. Expressão proteína p16: (1) Positivo (0-25%, 26-50%, 51% ou mais) (2) Negativo	P16
11. Resultado do PCR para HPV: (1) Positivo (2) Negativo	HPV
12. Tipo de HPV: (1) 16 (2) 18 (3) outros	TIPOHPV

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

Este trabalho é composto do projeto de pesquisa, relatório de pesquisa e do artigo construído a partir da análise condizente com os objetivos supracitados. O volume está sendo escrito pelo acadêmico Luís Filipe Bortolotto Ugalde, sob a orientação da professora Msc. Daniela Augustin Silveira e Coorientação da professora Dr^a. Jossimara Polettini. É importante ressaltar que este estudo visa agregar a análise já promovida pela aluna Ana Cláudia de Alcântara Amaro através do TCC “Câncer de cavidade oral e orofaringe: fatores de risco e expressão da proteína p16” sob orientação da professora Msc. Daniela Augustin Silveira, cuja aprovação deste pelo Comitê de Ética do Hospital São Vicente de Paulo e pelo CEP aconteceu em 2018 – este último está no Anexo A. Assim, será acrescentada a análise da presença do Papilomavírus humano (HPV) através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nas 42 amostras já analisadas previamente para a expressão imuno-histoquímica da proteína p16, em que se obteve um índice de positividade em 16% dos casos. A expressão da proteína p16 pode estar relacionada com a presença do vírus HPV e esta associação contribui para o desenvolvimento e comportamento biológico destas neoplasias, bem como informa acerca do perfil dos pacientes, justificando o objetivo levantado pelo presente projeto. Em suma, faz-se de extrema importância a confirmação da presença do vírus HPV nos casos com expressão positiva da proteína p16.

A definição do tema ocorreu em início de Agosto de 2019, cuja ideia tinha surgido já no terceiro semestre, período em que a professora Daniela abordou em aula a pesquisa realizada pela Ana Cláudia de Alcântara Amaro e despertou-me interesse a possibilidade de avaliar a carcinogênese promovida por agentes virais. Sendo assim, após a definição do tema, seguiu-se da escolha da coorientação da professora Dr^a. Jossimara Polettini e da elaboração do projeto através da disciplina de Pesquisa em Saúde prevista na matriz curricular do curso de Medicina do Campus Passo Fundo. A pesquisa foi realizada a partir da análise dos dados previamente coletados do Laboratório de Patologia do HSVP, dos resultados obtidos pela acadêmica Ana Claudia de Alcântara Amaro e do resultado da análise adicional proposta por este projeto através da técnica do

PCR nas mesmas amostras. Esta informação acerca da análise extra foi acrescentada ao projeto original na Plataforma Brasil através de uma emenda, cuja aprovação através do número de CAAE 84787818.7.0000.5564 ocorreu no dia 26/09/2020 e está no Anexo B, sendo importante ressaltar que não houve nenhuma abordagem adicional quanto a coleta de dados clínicos ou de material biológico.

Sendo assim, o acadêmico teve acesso às amostras diretamente com a orientadora, uma vez que o arquivo biológico estava sob posse da equipe que constituiu o estudo prévio realizado pela aluna Ana Claudia de Alcântara. Portanto, o início do preparo das amostras para a aplicação da técnica do PCR, ou seja, o corte das mesmas em micrótomo, iniciou em final de Setembro de 2020 após a aprovação da emenda, cuja realização se deu pelo acadêmico com o auxílio do técnico do laboratório, bem como da orientadora e da coorientadora. Após este procedimento, em Outubro do mesmo ano iniciou-se o processo de desparafinização e de aplicação da técnica PCR. Todas etapas citadas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da UFFS e através de financiamento próprio. Devido ao cancelamento das atividades práticas no Campus Passo Fundo e a falta de material para análise, a análise de PCR foi finalizada em Janeiro.

Nesse sentido, devido a mudança no calendário acadêmico em 2020, o trabalho sofreu alterações perante o cronograma inicial. A coleta de dados foi estendida aos meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2020, bem como a redação e divulgação dos dados foi estendida até os meses de Janeiro e Fevereiro de 2021.

A coleta dos dados referentes ao prontuário e anatomopatológico iniciou em Agosto e foi finalizada no mês de Janeiro. Em relação às variáveis, deve-se destacar que foi acrescentada a cor da pele como uma variável sociodemográfica e foram descritas as características anatomopatológicas dos tumores, obtidas através dos exames anatomopatológicos e dos prontuários dos pacientes.

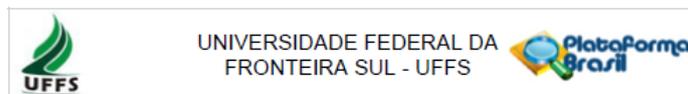
É importante atentar que a análise do resultado da pesquisa de HPV pela técnica de PCR nas amostras juntamente com os dados já coletados pela graduanda Ana Cláudia – expressão de proteína p16 e perfil do paciente – foi feita em dois momentos. Primeiramente foi analisada a associação entre a

detecção do DNA-HPV e as informações do paciente (como idade e sexo) e posteriormente foi descrita a associação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína p16 e a presença do DNA-HPV. Em relação a esta última análise, alteraram-se as variáveis categóricas, uma vez que a expressão da proteína p16 é consequência da presença do DNA-HPV: expressão imuno-histoquímica da proteína p16 tornou-se variável categórica dependente, enquanto a detecção do DNA-HPV tornou-se categórica independente. Também, foi refeita a análise da associação de p16 com as variáveis sociodemográficas.

A desparifinização e a aplicação da técnica de PCR nas amostras foram finalizadas em Janeiro, feitas pelo acadêmico sob orientação da professora Jossimara e ocorrendo de forma concomitante com a escrita do artigo. Importante destacar que não foi possível verificar o subtipo viral, sendo este objetivo elencado para ser realizado posteriormente. Todos os dados foram coletados e duplamente digitados para uma planilha eletrônica e transcritos para a ferramenta do PSPP versão livre, no qual foi averiguada a associação das variáveis dependentes e independentes por meio do teste Qui-Quadrado com nível de significância de 5%. Após a produção, o artigo científico foi adequado de acordo com as normas do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, revista a qual será submetido. As normas da revista estão presentes no Anexo C.

2.2.1 Anexos

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe: Fatores de Risco e expressão da proteína P16

Pesquisador: Daniela Augustin Silveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84787818.7.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.673.402

Apresentação do Projeto:

Já apresentado no parecer nº 2.658.209

Objetivo da Pesquisa:

Já apresentado no parecer nº 2.658.209

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já apresentado no parecer nº 2.658.209

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora atendeu a pendência indicada pelo CEP e descreveu a forma de devolutiva dos resultados da pesquisa à instituição na qual os dados serão coletados.

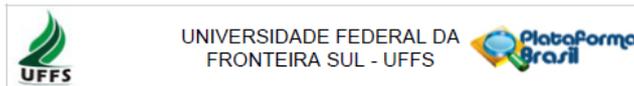
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já apresentado no parecer nº 2.658.209

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimentos éticos ao desenvolvimento do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:



Continuação do Parecer: 2.673.402

Outros	carta_resposta_cep.doc	10/04/2018 21:25:01	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	08/04/2018 20:02:14	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2018 19:57:41	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Rosto	20180405_191806.pdf	08/04/2018 19:54:37	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TCCAC.pdf	07/03/2018 16:44:23	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RECURSOS.pdf	07/03/2018 16:43:26	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	07/03/2018 16:41:13	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

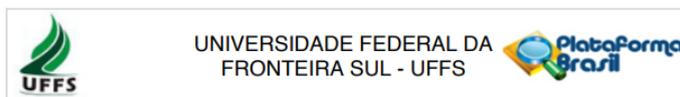
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 24 de Maio de 2018

Assinado por:
Valéria Silvana Faganello Madureira
(Coordenador)

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe: Fatores de Risco e expressão da proteína P16

Pesquisador: Daniela Augustin Silveira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 84787818.7.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.301.338

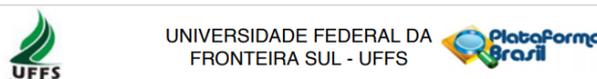
Apresentação do Projeto:

Trata de emenda ao projeto de pesquisa encaminhada sob a justificativa de:

Solicito emenda ao projeto supracitado, a qual propõe a adição de uma pesquisa molecular de Papilomavírus Humano (HPV) além da expressão proteica de p16 anteriormente previsto, e, portanto, extensão do cronograma do projeto inicial com previsão de término em dezembro de 2018. Paralelamente à solicitação dessa emenda, está sendo enviado um relatório parcial com os resultados iniciais, no entanto, esses dados poderão ser complementados com os objetivos agora propostos. Justifica-se a emenda uma vez que o estudo é retrospectivo, de amostras provenientes de tumores de cavidade oral e orofaringe preservadas em parafina, das quais será extraído o DNA total. Nesse material previamente selecionado e analisado para proteína p16 contém DNA humano e de possíveis infectantes, como DNAs virais e bacterianos. Embora a técnica prevista no projeto inicial (imunistoquímica) seja diferente da proposta nessa emenda (PCR), o material utilizado será o mesmo e a equipe possui experiência laboratorial para a realização das análises. Dessa forma, nenhuma abordagem adicional quanto à coleta de dados clínicos ou coleta adicional de material biológico serão necessárias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Verificar fatores associados com a expressão positiva da proteína P16 e estimar a prevalência de infecção por HPV nas amostras de carcinoma de células escamosas de orofaringe



Continuação do Parecer: 4.301.338

e cavidade oral, bem como sua associação com a positividade da reação imuno-histoquímica para proteína p16.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: há o risco de identificação do paciente. A fim de minimizar esse risco, os dados serão manuseados apenas pela equipe de pesquisa que se compromete a não divulgar as informações e manter o sigilo nos dados de identificação. Além disso para evitar a concretização do risco de identidade revelada será atribuído um número a cada paciente ao invés das iniciais do nome. No caso de riscos não previstos ocorrerem em níveis acima dos aceitáveis, a atividade desenvolvida será interrompida. Benefícios: Devido à natureza do estudo, não estão previstos benefícios diretos ao paciente. A equipe fornecerá uma devolutiva à instituição envolvida na forma de um relatório, documentando os resultados obtidos na pesquisa. Além disso, a comunidade poderá ser beneficiada com esses resultados se estes forem utilizados em futuros trabalhos e na prática clínica através de ações de prevenção e tratamento do câncer de orofaringe.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A alteração do projeto de pesquisa está justificada adequadamente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências éticas

Considerações Finais a critério do CEP:

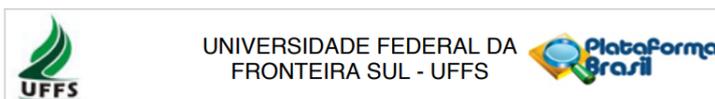
Prezado (a) Pesquisador(a)

A emenda está aprovada.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador".

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.



Continuação do Parecer: 4.301.338

2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.

3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicação dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

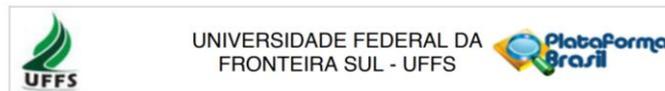
Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a "central de suporte" da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_1620355_E1.pdf	18/09/2020 18:01:37		Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Solicitacao_Emenda_p16_HPv_tumores_assinado.pdf	18/09/2020 18:00:08	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_p16_HP_emenda_PlatBrasil_2.pdf	18/09/2020 17:59:13	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	carta_resposta_parecer2.doc	18/05/2018 10:37:01	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	carta_resposta_cep.doc	10/04/2018 21:25:01	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	08/04/2018 20:02:14	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2018 19:57:41	Daniela Augustin Silveira	Aceito



Continuação do Parecer: 4.301.338

Ausência	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2018 19:57:41	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Fosto	20180405_191606.pdf	08/04/2018 19:54:37	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RECURSOS.pdf	07/03/2018 16:43:26	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	07/03/2018 16:41:13	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 26 de Setembro de 2020

Assinado por:
Fabiane de Andrade Leite
(Coordenador(a))

ANEXO C – NORMAS REVISTA JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade contínua, é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts, além de ser integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado em inglês e português, com resumo em português e espanhol.

ANÁLISE DOS TRABALHOS

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

ÉTICA

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho enviado deverá ser acompanhado de cópia do comprovante de aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (exceto dados de domínio público).

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996).

As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão.

Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas com acurácia ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na secção de Agradecimentos (Acknowledgements). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo.

Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

TITULAÇÃO

O nome dos autores deverá ser referido da seguinte forma: primeiro nome e último sobrenome serão grafados por extenso e nomes intermediários serão abreviados. Acrescentar após o nome de cada autor seu respectivo ORCID. Deve-se inserir nos créditos apenas a Instituição onde cada autor atua. O nome da instituição será grafado em português ou no idioma do país sede da instituição, relacionado por número ao nome dos autores correspondentes.

RESUMOS E UNITERMOS

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais e artigos de revisão; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves).

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês.

AGRADECIMENTOS

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

ESTRUTURA DO TEXTO

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. (links para pesquisa:

1. <https://usp.br/sddarquivos/arquivos/vancouver.pdf>.
2. <http://www.abenmt.org.br/VancouverNormas-2017.pdf>.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>).

Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor)

Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.

- Artigos de periódicos (até seis autores)

Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.

- Artigos de periódicos (mais de seis autores)

Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.

- Artigo de periódico on-line

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em:

<http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.

- Livros no todo (dois autores)

Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.

- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor

Mendeenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

- Parte de livro em meio eletrônico

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.

- Evento em meio eletrônico

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

- Tese ou dissertação

Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

- Citações no texto

Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de

um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

TABELAS E FIGURAS

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png.

ABREVIações E NOMES DE MEDICAMENTOS

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Associação da positividade de HPV e proteína p16 em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

Association of HPV positivity and p16 protein in head and neck squamous cell carcinoma samples

Luís F. B. Ugalde¹; Jossimara Poletini¹; André R. Mozzini²; Daniela A. Silveira¹;

1. Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil
2. Hospital São Vicente de Paulo, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os carcinomas de células escamosas (CCE) de cavidade oral e orofaringe têm sido amplamente estudados acerca de sua carcinogênese. Nesse sentido, pesquisas recentes demonstram aumento da incidência da infecção do Papilomavírus Humano (HPV) nesses tumores, o que sugere o papel etiológico do vírus na indução destas neoplasias.

OBJETIVO: Determinar o perfil sociodemográfico e clinicopatológico de pacientes com CCE de cavidade oral e orofaringe e avaliar a associação da presença de HPV e expressão de proteína p16 nas amostras tumorais.

MÉTODOS: Estudo transversal, no qual foram analisados casos de CCE de cavidade oral e orofaringe em que o diagnóstico ocorreu entre os anos de 2010 a 2016 e cujo exame anatomopatológico foi realizado no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), Passo Fundo RS. Os dados demográficos foram obtidos do prontuário dos pacientes, enquanto as características clinicopatológicas foram coletadas da descrição anatomopatológica. As

amostras tumorais foram avaliadas quanto à expressão da proteína p16 pela técnica de imunohistoquímica e quanto à presença de DNA-HPV pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre a expressão proteica, infecção e as variáveis estudadas, e o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS: No período estudado, foram identificados 42 casos de CCE. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (73,8%), com idade média de 58 anos, cor de pele branca (90,5%), tabagista (76,1%) e/ou etilista (64%). Do total, obteve-se superexpressão da proteína p16 em sete casos e o DNA-HPV foi detectado em três amostras. Não houve associação estatística significativa entre essas variáveis.

CONCLUSÃO: 7 casos apresentaram superexpressão de proteína p16, e, quanto a detecção positiva de DNA-HPV, 3 casos foram positivos. Estes dois grupos compartilham de semelhanças: perfil mais jovem, tumor com estadiamento avançado e lesões situadas, sobretudo, em orofaringe. Apenas um caso obteve coexistência de superexpressão e detecção de DNA-HPV, enquanto outros dois casos obtiveram a superexpressão com ausência de DNA-HPV e sem histórico de tabagismo. Esta última situação pode ser explicada pela falta de material genético para análise da presença do genoma viral.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano; Reação em Cadeia da Polimerase; Neoplasias de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Squamous cell carcinomas (SCC) of the oral cavity and oropharynx have been widely studied in regards to their carcinogenesis. In this context, recent research has shown an increasing incidence of the HPV infection in such tumors, which suggests the etiological role of the virus in inducing these neoplasms.

OBJECTIVE: To determine the sociodemographic and clinical-pathological profile of patients with SCC of the oral cavity and oropharynx and to assess the association between the presence of Human Papillomavirus (HPV) and the p16 protein expression tumoural samples.

METHODS: Cross-sectional study, of which SCC cases of oral cavity and oropharynx were analyzed upon which the diagnosis had occurred between the years of 2010 to 2016 and whose anatomopathological examination was performed at Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), in Passo Fundo RS. Demographic data were obtained from patients' medical

records, while clinicopathological characteristics were collected from the anatomopathological description. The tumoural samples were evaluated for the expression of the p16 protein by immunohistochemistry and for the presence of DNA-HPV by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The chi-square test was used to assess the association between protein expression, infection and the studied variables, and the significance level adopted was 5%.

RESULTS: During the studied period, 42 cases of SCC were identified. Most patients were male (73.8%), mean age of 58 years, white skin color (90.5%), smoker (76.1%) and/or alcoholic (64%). Of the total, p16 overexpression was obtained for seven cases and the DNA-HPV was detected in three samples. There was no statistical significant association between these variables.

CONCLUSION: 7 cases presented p16 protein overexpression, and regarding the positive detection of HPV-DNA, 3 cases were positive. These two groups share similarities: younger profile, tumor with advanced staging and lesions located mainly in the oropharynx. Only one case obtained the coexistence of overexpression and detection of HPV-DNA, while two other cases obtained overexpression with no HPV-DNA and no history of smoking. This last situation can be explained by the lack of genetic material for analysis of the presence of the viral genome.

Key-words: Papillomaviridae; Polymerase Chain Reaction; Head and Neck Neoplasms.

INTRODUÇÃO

Os cânceres de cavidade oral e orofaringe tem alta prevalência mundial, e, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC), no ano de 2020, foram registrados o surgimento de 476 mil novos casos nestes sítios em todo o mundo ⁽¹⁾. Além disso, o Brasil é considerado o país com a maior incidência de cânceres de boca na América do Sul, constituindo um problema de saúde pública ⁽²⁾. Nesse sentido, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) calcula que, durante o biênio de 2020-2022, 14 mil brasileiros serão acometidos com neoplasias malignas situadas nestes locais, em que o principal tipo histológico, representando 90% dos casos, é o carcinoma de células escamosas (CCE) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾. Sendo assim, fica evidente a relevância epidemiológica e clínica de CCE de cavidade oral e orofaringe no país.

Sabe-se que os principais fatores associados ao surgimento destas neoplasias envolvem o tabagismo e o consumo de álcool em excesso, cujo risco daqueles que tem exposição a ambos aumenta consideravelmente devido ao efeito sinérgico ⁽³⁾. Ainda assim,

existe acometimento em pacientes sem tais exposições, como comprovado através da associação entre o CCE de lábio e a exposição à radiação ultravioleta, bem como a predisposição genética ou a presença de infecção pelo papilomavírus humano (HPV) ⁽⁵⁾. Em relação a este último, sabe-se que os subtipos virais de alto risco estão associados à carcinogênese de orofaringe ⁽⁶⁾. Ainda, entre os tipos possíveis de cânceres de cabeça e pescoço, o CCE situado nesta localização e associado ao HPV é o único que apresenta taxas crescentes de incidência ⁽⁶⁾. Nesse sentido, as taxas encontradas nos anos 90 denotavam o percentual de 50% dos cânceres de orofaringe atribuíveis ao HPV, enquanto recentemente têm-se encontrado associação em 70-80% dos casos na América do Norte e Europa ⁽⁷⁾.

Atualmente está bem documentado o risco associado entre o HPV de alto risco e outros CCEs de cabeça e pescoço ⁽⁸⁾. Ainda assim, estão sendo estudados quais subtipos de HPV atuam com maior tropismo em outros sítios do trato aerodigestivo superior, como na cavidade oral em que, ainda que seja estabelecida a associação entre o subtipo 16, não há evidências suficientes entre a presença do subtipo 18 e o surgimento de neoplasias neste local ⁽⁹⁾. Nesse sentido, pesquisas recentes têm denotado o aumento da incidência de infecção de HPV em cânceres de cabeça e pescoço, ampliando a discussão acerca da contribuição dos subtipos virais na carcinogênese ⁽¹⁰⁾. Também, é importante destacar que poucos estudos são realizados, sobretudo no Brasil, acerca da frequência de infecção do HPV especificamente em CCE de cavidade oral ⁽¹¹⁾.

Tendo em vista a relevância clínica e científica da detecção do HPV, faz-se uso de técnicas de biologia molecular a fim de rastrear sua presença em tecidos biológicos. Desse modo, têm-se que a proteína p16 é um biomarcador frequentemente utilizado por estar superexpressa em tumores associados ao HPV, uma vez que este atua sob a maquinaria celular acarretando em perda da inibição desta proteína ⁽⁸⁾. Dessa forma, faz-se uso da técnica imunoistoquímica para detecção da proteína p16, sendo considerada uma ferramenta altamente sensível para tumores associados ao HPV e que colabora para verificação do status da infecção ⁽¹²⁾. Porém, são técnicas que permitem a detecção do genoma viral que são consideradas padrão ouro, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou a hibridização in situ ⁽¹²⁾.

Dessa forma, faz-se necessário caracterizar a exposição e a apresentação de casos de CCE de cavidade oral e orofaringe em populações específicas, a fim de compreender os fatores de risco e orientar medidas em saúde pública. Também, é importante esclarecer a patogênese do HPV e seus subtipos em carcinomas da cavidade oral e orofaringe. Sendo assim, este trabalho visa descrever o perfil sociodemográfico e clinicopatológico, englobando a investigação da prevalência de HPV em casos de CCE de cavidade oral e

orofaringe referentes a pacientes que realizaram procedimento cirúrgico no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) em Passo Fundo-RS.

MÉTODOS

Caracterização do estudo e amostragem

Trata-se de um estudo transversal, desenvolvido no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul, em Passo Fundo-RS, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFFS (CAAE 84787818.7.0000.5564).

A amostra foi constituída de casos de carcinoma de células escamosas selecionados através da data de diagnóstico do exame anatomopatológico de neoplasia localizada em cavidade oral e/ou orofaringe entre os anos de 2010 e 2016 no Laboratório de Patologia do HSVP.

As variáveis sociodemográficas foram obtidas através do prontuário dos pacientes, sendo analisados: sexo, cor, idade, histórico de tabagismo, histórico de consumo de bebida alcoólica, óbito por câncer, tempo de evolução para óbito, origem do encaminhamento e estadiamento. Também, foram analisados os resultados dos exames anatomopatológicos referentes aos casos, caracterizando-os de acordo com as seguintes variáveis: local do tumor, tipo de lesão, diferenciação histopatológica e invasão de tecidos. Excluíram-se os casos com preenchimento inadequado ou ausência dos dados clínicos e epidemiológicos.

Detecção de p16 e HPV

As amostras de tecido tumoral dos casos selecionados armazenadas em blocos de parafina foram seccionadas em micrótomo comum e avaliadas quanto à expressão da proteína p16 pela técnica de imunistoquímica, realizada no Laboratório de Patologia do HSVP. Resumidamente, a desparafinização e recuperação antigênica foram realizadas em instrumento FLEX Dako de alto pH, seguida de Incubação com anticorpo primário p16INK4A (clone IHCO16- Dako) por 20 minutos em temperatura ambiente. A amplificação foi realizada em sistema EnVision FLEX (Dako), com anticorpo secundário e revelados com o sistema cromogênico DAB+líquido Flex (Dako) e contra coloração com Hematoxilina. Como controle positivo de expressão de p16 foi utilizada amostra de câncer de colo de útero. A leitura das lâminas foi realizada por dois observadores através da estratégia epidemiológica de mascaramento a fim de evitar viés de aferição (duplo cego). A positividade de p16 nos tecidos tumorais foi considerada a partir de visualização de

coloração celular (nuclear e citoplasmática) marrom, com contagem de 500 células em 5 campos no aumento de 400x em microscópio óptico. Para análise qualitativa dos casos, a superexpressão de p16 foi considerada nos casos em que 70% do tecido observado apresentava reatividade com intensa coloração.

A detecção da presença do DNA- HPV foi determinada através da técnica de PCR. Os casos de CCE oral e/ou orofaringe selecionados para o estudo, armazenados em blocos de parafina, foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 6 µm de espessura, acondicionados em microtubos estéreis. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desparafinização e extração de DNA total utilizando-se reagentes comerciais - *GeneJET FFPE DNA Purification Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), segundo especificações do fabricante.

Após a extração do DNA, foi realizada a pesquisa de HPV através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores MY09 e MY11, que flanqueiam uma região conservada do gene L1 do HPV, e que gera um produto amplificado de 450pb, seguido de Nested-PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno à região anterior para ampliar a sensibilidade da reação ⁽¹³⁾.

As reações de PCR e Nested-PCR foram realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de Go Taq Green Master Mix 2X (Promega, WI, USA); 0,6µL de cada primer na concentração de 10uM; 5,8 µL de água estéril e 3µL de cada amostra pesquisada. As incubações foram realizadas em termociclador com os parâmetros de 95°C durante 5 minutos para desnaturação, seguidos de 30-35 ciclos de termociclagem de acordo com os parâmetros dos *primers* utilizados, incluído ciclo de desnaturação, anelamento dos *primers* e polimerização da dupla fita de DNA. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa. A eficiência da extração do DNA das amostras estudadas foi verificada pela amplificação do gene constitutivo da β-globina.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corado com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pares de base (pb) e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta em equipamento L-PIX (Loccus Biotecnologia, SP, BR).

Análise Estatística

Os dados foram duplamente digitados em planilha eletrônica e transcritos para a ferramenta PSPP (distribuição livre). A análise estatística foi realizada por meio do teste Qui-Quadrado ou Exato de Fischer, atribuindo nível de significância de 5%, em dois

momentos: primeiramente foi estudada a associação entre as variáveis sociodemográficas (variável independente) e a detecção do DNA-HPV (dependente) e, posteriormente, a associação entre este último e a expressão da proteína p16 (variável dependente).

RESULTADOS

No período do estudo foram analisados 42 casos de CCE de cavidade oral e orofaringe (**Tabela 1**). O sexo mais frequente foi masculino, representando 73,8%. Em relação a faixa etária, a idade média dos pacientes foi de 58 anos, com desvio padrão de 13,1. Os extremos são representados pela idade mínima de 19 anos e a máxima de 88 anos. Quanto a etnia, verifica-se maior prevalência em pacientes brancos que em outros, cuja porcentagem encontrada foi de 88,1% dos casos. Os outros correspondem a pacientes pardos (9,5%) e a apenas 1 caso de cor de negra.

Houve alta prevalência de fatores de risco envolvidos na carcinogênese de tumores de cavidade oral e orofaringe: 76,1% dos pacientes foram ou são tabagistas, enquanto 64% são ou foram alcoolistas (**Tabela 1**). Destes, 74% ainda mantinham o consumo de bebida alcoólica e 90,6% ainda eram tabagistas no momento do diagnóstico.

Em relação ao desfecho em óbito, obteve-se a informação acerca de 39 pacientes (**Tabela 1**). Deste total, 46,1% deles foram a óbito por câncer. No que diz respeito ao tempo de evolução até esse desfecho, não foi registrada a informação acerca de um caso. Porém, daqueles que se tem registro, 29% foram a óbito em menos de 6 meses, enquanto 53% tiveram a evolução em um período maior que 12 meses.

TABELA 1 - Resumo das características sociodemográficas dos 42 casos de CCE de cavidade oral e orofaringe diagnosticados no Laboratório de Patologia do HSVP. Passo Fundo, RS. 2020.

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	31	73,8
Feminino	11	26,2
Cor		
Branca	37	88,1
Parda	4	9,5
Preta	1	2,4
Idade		
19-34	2	4,8
35-54	12	28,5
55-74	23	54,8
≥ 75	5	11,9
Histórico de Tabagismo		
Nunca	10	23,8
Ex-consumidor	3	7,1
Tabagista	29	69
Histórico de Consumo de bebida alcoólica		
Nunca	13	30,9
Ex-consumidor	7	16,7
Sim	20	47,6
Sem informação	2	4,8
Óbito por Câncer		
Sim	18	42,9
Não	21	50
Sem informação	3	7,1
Tempo evolução para óbito (n = 18)		
< 6 meses	5	27,8
6 meses - 12 meses	3	16,7
>12 meses	9	50
Sem informação	1	5,5
Estadiamento		
1	13	30,9
2	3	7,1
3	5	11,9
4	14	33,3
Sem informação	7	16,7

Sobre o aspecto clinicopatológico, a predominância de apresentação das lesões foi sob a forma ulcerada (73,8%) e a principal localização é a língua (38%), dados presentes na **Tabela 2**. A classificação histológica foi, sobretudo, moderada ou bem diferenciada, englobando 62% dos casos. Foram encontradas invasão angiolinfática ou perineural em 26,2 % dos casos.

Ainda nesse sentido, têm-se a informação de 35 pacientes em relação ao estadiamento (**Tabela 2**). Destes, obteve-se uma distribuição predominante nos extremos

da classificação: 37% apresentaram estadiamento I, enquanto 40% apresentaram estadiamento IV.

Verificou-se que 7 amostras (16,7%) apresentam superexpressão da proteína p16 (Tabela 2). A Figura 1 representa as células tumorais, enquanto a Figura 2 demonstra a marcação positiva para proteína p16. Em relação à pesquisa de DNA-HPV, o DNA foi recuperado em 35 (83,3%) das amostras, e, destas, 3 foram positivas para essa análise (8,6%) (Tabela 2). A Figura 3 demonstra o resultado de uma amostra positiva para o DNA-HPV.

TABELA 2 - Resumo das características clinicopatológicas dos casos de CCE de cavidade oral e orofaringe diagnosticados no Laboratório de Patologia do HSVP. Passo Fundo, RS. 2020.		
Variáveis	n	%
Local do tumor		
Língua	16	38
Orofaringe	12	28,6
Assoalho da boca	6	14,3
Palato	5	11,9
Cavidade Oral (não especificado)	1	2,4
Gengiva	1	2,4
Mucosa da bochecha	1	2,4
Tipo lesão		
Lesão ulcerada	31	73,8
Nódulo	3	7,1
Infiltrativa	3	7,1
Plana	2	4,8
Placa	1	2,4
Vegetante	1	2,4
Sem informação	1	2,4
Diferenciação Histopatológica		
Bem	13	31,0
Moderado	13	31,0
Pouco	9	21,4
Sem informação	7	16,7
Invasão		
Angiolinfática	9	21,4
Perineural	2	4,8
Sem invasão	8	19,0
Sem informação	23	54,8
Estadiamento		
1	13	31
2	3	7,1
3	5	11,9
4	14	33,3
Sem informação	7	16,7
p16		
Positivo	7	16,7
Negativo	35	83,3
HPV		
Positivo	3	7,1
Negativo	32	76,2
Não avaliado	7	16,7

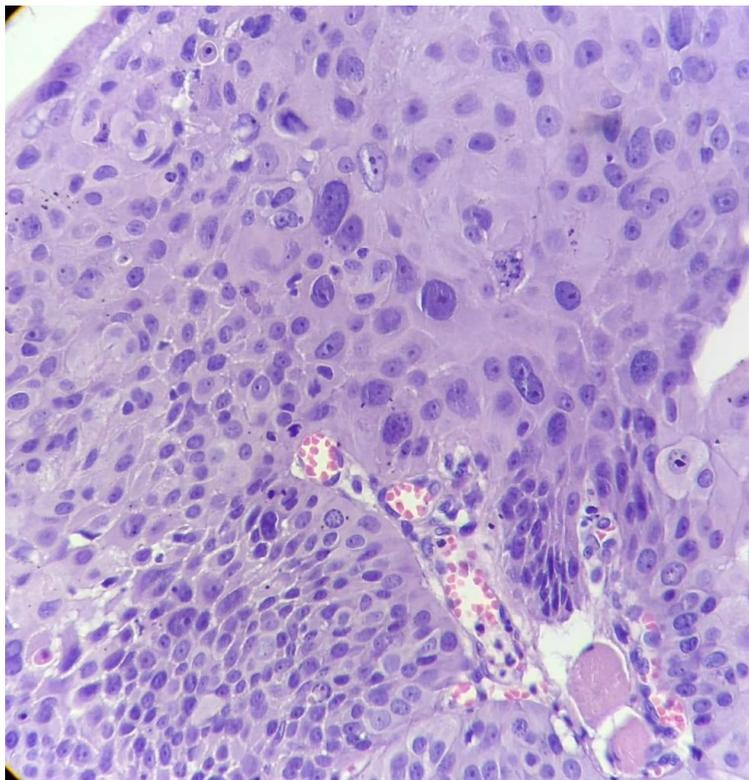


Figura 1: Microfotografia apresentando imagem das células tumorais – carcinoma de células escamosas. Coloração HE, aumento de 400x. Fonte: autor.

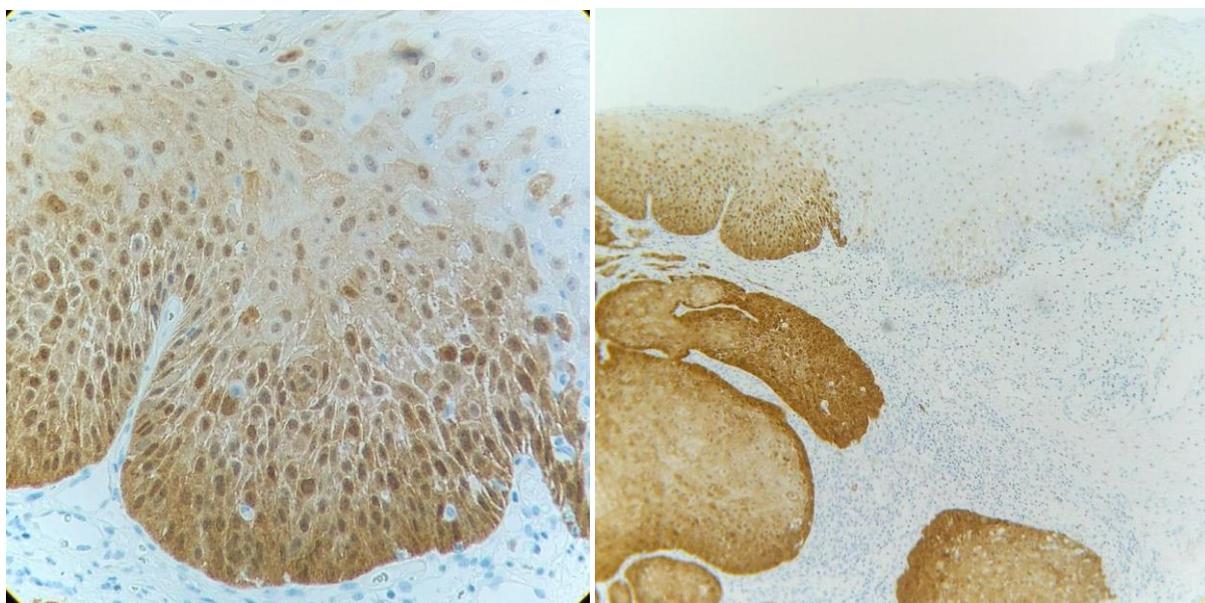


Figura 2: (A) Microfotografia apresentando a imagem da reação imunoistoquímica do tumor – Células coradas em marrom evidenciam a presença da proteína p16. Coloração DAB com contracoloração de hematoxilina, aumento de 100x. (B) Aumento de 400X. Fonte: autor.



Figura 3. Gel de agarose corado com brometo de etídeo após eletroforese para separação e visualização das bandas representativas do gene do HPV. Fonte: autor. (PM: peso molecular 100 pares de base (bp); tamanho esperado do produto amplificado: 150pb; linha1: controle positivo – células Hela; linhas 23 e 24: controles negativos da PCR; linha 12: amostra positiva).

As variáveis sociodemográficas foram associadas quanto à superexpressão do p16 e presença de DNA-HPV (**Tabela 3**). Observou-se que, apesar de não ser estatisticamente significativo, os pacientes com superexpressão são mais jovens, com média de 56 anos, homens, brancos, tumor com predominância em orofaringe (4 casos) e com classificação em estadiamento mais avançado. A presença de HPV foi detectada em 3 pacientes, cuja média de idade é 53,7 anos, caracterizados por um perfil predominante feminino, cor de pele branca, com exposição ao tabaco e álcool, e tumor com localização predominante em orofaringe e estadiamento avançado. A associação entre esta detecção e as variáveis também não obteve significância estatística.

TABELA 3 - Características sociodemográficas, expressão da proteína p16 e detecção de HPV dos 42 casos de CCE de cavidade oral e orofaringe diagnosticados no Laboratório de Patologia do HSVP. Passo Fundo, 2020.

Variáveis	p16 + n (%)	p16 - n (%)	*p	HPV + n (%)	HPV - n(%)	*p
Sexo			0,43			0,98
Masculino	6 (19,4)	25 (80,6)		1 (3,2)	30 (96,8)	
Feminino	1 (9,1)	10 (90,9)		2 (18,2)	9 (81,8)	
Idade (anos completos)			0,1			0,93
19-54	4 (30,8)	9 (69,2)		1 (7,7)	12 (92,3)	
55-88	3 (10,3)	26 (89,7)		2 (6,9)	27 (93,1)	
Cor			0,29			0,51
Branco	7 (18,9)	30 (81,1)		3 (8,1)	34 (91,9)	
Não branco	0	5 (100)		0	5 (100)	
Histórico de Tabagismo			0,75			0,69
Sim	5 (15,6)	27 (84,4)		2 (6,3)	30 (93,8)	
Não	2 (20)	8 (80)		1 (10)	9 (90)	
Histórico de consumo de bebida alcoólica			0,52			0,97
Sim	4 (14,8)	23 (85,2)		2 (7,4)	25 (92,6)	
Não	3 (23,1)	10 (76,9)		1 (7,7)	12 (92,3)	
Estadiamento			0,67			0,78
1	2 (15,4)	11 (84,6)		1 (7,7)	12 (92,3)	
2	0	3 (100)		0	3 (100)	
3	1 (14,3)	6 (85,7)		0	7 (100)	
4	3 (23,1)	10 (76,9)		2 (15,4)	11 (84,6)	

* Teste do Qui-Quadrado

A associação entre superexpressão de p16 e positividade de DNA-HPV está apresentada na **Tabela 4**. Apenas 1 caso apresentou superexpressão de proteína p16 e presença de HPV. Importante ressaltar que 2/7 amostras positivas para p16 não foram analisadas quanto à presença de HPV por material inadequado para essa análise. Dessa forma, não foi observada associação entre essas variáveis ($p=0,37$).

Tabela 4 - Associação entre superexpressão de proteína p16 e positividade de DNA-HPV

HPV	P16		TOTAL
	SIM	NÃO	
SIM	1	2	3
NÃO	6	33	39
	7	35	42

Teste do Qui-Quadrado, $p > 0,05$

DISCUSSÃO

O sexo mais frequente dos casos foi o masculino, idade média de 58 anos, cor de pele branca e com alta prevalência de exposição ao tabagismo e alcoolismo. As lesões estavam, sobretudo, localizadas na língua, sob forma ulcerada, predominantemente moderada e bem diferenciadas e com invasão de tecidos. Obteve-se superexpressão de proteína p16 em 7 casos e detecção de DNA-HPV em 3 amostras.

Encontrou-se predominância dos casos de CCE de cavidade oral e orofaringe no sexo masculino, em consonância com a literatura. Em estudo realizado na região central do Brasil, *Petito et al. (2017)* encontraram uma taxa de prevalência de 78% de casos no sexo masculino em carcinomas de cavidade oral e orofaringe, valor próximo ao verificado neste trabalho ⁽⁴⁾. Em levantamento realizado no México, obteve-se prevalência de 71% em homens, bem como em estudos realizados na Europa ^(14,15). Nesse sentido, é importante destacar a proporção de 3:1 homem:mulher encontrada no estudo realizado no México, uma vez que, apesar da predominância no sexo masculino, existe uma taxa crescente de incidência de câncer de cabeça e pescoço no sexo feminino, cuja relação em meados dos anos sessenta era de 6:1 e, na atualidade, está em cerca de 4:1 ⁽¹⁴⁾.

Neste estudo, verifica-se que 66,7% dos pacientes possuem idade igual ou maior a 55 anos, sendo que a média obtida foi de 58 anos. Esta corresponde a encontrada na literatura, como em estudo brasileiro e outro realizado no México cuja média encontrada

foi semelhante^(4,14). Em pesquisa realizada na Espanha, verificou-se o valor de 62,7 anos⁽¹⁶⁾. A predominância desta faixa etária denota que a idade avançada está associada ao acúmulo de exposições, sobretudo ao álcool e tabaco, acarretando em maiores taxas das neoplasias de cabeça e pescoço em indivíduos mais velhos⁽²⁾.

Também, foi encontrada predominância em indivíduos brancos, em consonância com a literatura científica, em que se denota que estes são mais acometidos por câncer de cabeça e pescoço^(17,18). Ainda assim, existem pesquisas, como a realizada no Espírito Santo, em que esta predominância não ocorre, fato que pode estar relacionado com a miscigenação de cada localidade⁽¹⁸⁾. Isto também seria reflexo da dificuldade de estabelecer um critério para determinação da cor de pele.

Em relação a alta prevalência de exposição ao tabaco e álcool, deve-se destacar que ambos são os fatores de risco mais bem estabelecidos para o câncer de cavidade oral e orofaringe. Quando em sinergismo, aumentam em 30 vezes o risco de câncer de cavidade oral e orofaringe⁽³⁾. É importante ressaltar que as taxas encontradas estão de acordo com a literatura. Outro levantamento realizado na região central do Brasil encontrou valores próximos, demonstrando taxa de 78% de fumantes e 70% de consumidores de bebida alcóolica⁽⁴⁾. Ainda assim, essa taxa pode variar de acordo com o perfil epidemiológico e apresentar menor prevalência, como em estudo realizado no México, em que se encontrou uma frequência de 35% de alcoolistas e 51% de tabagistas⁽¹⁴⁾.

Assim como na literatura, foi observada uma taxa maior de tabagistas do que consumidores de álcool, uma vez que se atribui ao tabagismo o posto de maior fator de risco para o câncer de células escamosas de cabeça e pescoço⁽¹⁸⁾. Estima-se que 90% dos casos de câncer de cavidade oral em homens estão associados ao tabagismo⁽¹⁴⁾. Nesse sentido, foi observado que o hábito de colocar tabaco na mucosa oral, que é popular em algumas regiões dos Estados Unidos e Europa, aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de cavidade oral em lábio, língua e bochecha em cerca de 4 a 6 vezes⁽¹⁹⁾.

Também, verificou-se que, dos pacientes que se têm a informação acerca da evolução, aproximadamente metade tiveram como desfecho o óbito. Esta taxa elevada de mortalidade tem relação com a agressividade local e o alto índice de recorrência de tumores secundários associados a estas neoplasias⁽²⁰⁾. Alvarenga et. al. (2008) encontraram uma taxa de mortalidade de 38,4% em estudo sobre câncer de cabeça e pescoço realizado no Estado de São Paulo entre 2000-2005⁽¹⁷⁾. Ainda nesse aspecto, a sobrevida é uma mensuração que permite verificar a agressividade do câncer: segundo a American Cancer Society, a sobrevida geral em 5 anos do câncer de orofaringe é 70%⁽²¹⁾. Por outro lado, estruturas situadas na cavidade oral apresentam valores menores, como 52% em assoalho da boca e de 66% para a língua⁽²¹⁾. Porém, pode-se encontrar taxas ainda menores em estudos em populações específicas acerca de CCE de boca e

orofaringe na literatura. Por exemplo, estudo realizado na Alemanha encontrou a sobrevida global em 5 anos de 54,1% em pacientes com CCE nestes sítios supracitados, enquanto pesquisa feita em São Paulo (SP) verificou uma sobrevida de 45% em relação ao CCE de orofaringe ^(22, 23).

Um importante aspecto que impacta na sobrevida é a fase na qual o câncer é diagnosticado, sendo que quanto mais avançado, pior será a sobrevida ⁽¹⁸⁾. Assim, pode-se utilizar o estadiamento a fim de avaliar a extensão da doença. No presente estudo, verificou-se a porcentagem de 54,2% dos pacientes em estadiamento III e IV, logo, nota-se que o maior percentual dos pacientes foi diagnosticado em estágio avançado. Esta constatação é característica dos cânceres de cabeça e pescoço, cujo diagnóstico geralmente é realizado em fase tardia, sobretudo em instituições de países subdesenvolvidos ^(17,24). Nota-se que este aspecto já foi caracterizado pela literatura nacional: estudo realizado no Espírito Santo verificou que 78,4% dos pacientes possuíam estadiamento clínico III e IV, bem como pesquisa realizada em Santos – SP encontrou o percentual de 96% de CCE de orofaringe classificados nestes estadiamentos ⁽¹⁸⁾. Ainda assim, é importante destacar que o presente estudo encontrou um percentual relevante em estadiamento I, sendo esta a graduação atribuída a 31% dos casos.

A localização mais frequente das lesões foi na língua. Outro estudo realizado em Santos com base em CCEs de cavidade oral e orofaringe, encontrou-se 50% das lesões neste local. Perante a graduação histopatológica, verificou-se uma distribuição predominante das lesões em grau bem e moderadamente diferenciados. Nesse sentido, estudos nacionais denotam a distribuição predominante nessas graduações histológicas, em que as lesões bem ou moderadamente diferenciadas foram as mais frequentes ^(5, 25). Também, encontrou-se invasão de tecidos, como do sistema vascular, linfático e perineural. Sabe-se que estas estão relacionadas ao aumento do risco de recorrência local ou metástase ⁽²⁶⁾.

Nota-se que os pacientes que apresentaram superexpressão de proteína p16 ou detecção de DNA-HPV são mais jovens que aqueles com status negativo para HPV, ainda que não tenha ocorrido associação estatística significativa. Sabe-se que os cânceres de cabeça e pescoço associados ao HPV acometem uma faixa etária mais jovem, apresentando um pico bifásico entorno dos 30 e 55 anos, em comparação aos não associados, cuja média é cerca de 61 anos ⁽⁶⁾. Também, tem-se que este grupo apresenta menor exposição ao álcool e tabaco, porém, com associação ao uso de Marijuana ⁽⁸⁾. No presente estudo, foi encontrada uma menor prevalência de alcoolismo e tabagismo nos pacientes com p16 positivos.

Em relação ao estadiamento, os pacientes p16 e DNA-HPV positivos estavam em um grau mais avançado que os negativos, apesar da falta de evidência estatística. Ainda

assim, estes apresentaram menor desfecho em óbito em relação ao grupo p16 negativo. Nesse sentido, a literatura descreve que existe uma aparente maior agressividade biológica em câncer HPV positivo, que se manifesta com maior e mais precoce envolvimento linfonodal, ainda que apresentem um prognóstico melhor do que aqueles não associados ao vírus ⁽⁸⁾. Estudo realizado com base em dois levantamentos, em que 1058 pacientes apresentavam câncer de orofaringe avançado, observou que o grupo composto por casos HPV positivos (baseado na imunistoquímica para p16) obteve taxa de recorrência de 23,3%, em comparação ao grupo p16 negativo que apresentou uma taxa de 40,6% ⁽²⁷⁾.

A diferença no desfecho resultou em uma alteração na oitava edição TNM de estadiamento da Union for International Cancer Control (UICC), em que foram distinguidos tumores de orofaringe de acordo com a ocorrência de HPV. Observou-se que pacientes HPV positivo apresentavam diferença no desfecho em relação aos pacientes negativos caso expostos ao mesmo tratamento. Em suma, CCEs associados ao HPV possuem uma sobrevida melhor ⁽⁸⁾. Também, pesquisas sugerem que tumores com maior expressão de p16 apresentam melhor prognóstico que aqueles com baixa expressão ⁽²⁸⁾.

Quanto a localização, neste estudo o grupo p16 positivo e com detecção de DNA-HPV apresentou como sítio predominante a orofaringe, porém, sem evidência estatística de associação. Importante destacar que o câncer nesta localização tem apresentado aumento na incidência nos últimos anos, ainda que a prevalência de tabagismo e alcoolismo tenha apresentado declínio, bem como a incidência de neoplasias em laringe, hipofaringe e cavidade oral. Este quadro epidemiológico parece estar associado ao HPV ⁽²⁹⁾. Também, estudos abordam que esta característica está relacionada à mudança de comportamento sexual na população, identificando que pacientes com câncer de orofaringe são mais propensos a exposição sexual de risco, envolvendo a prática de sexo oral e maior número de parceiros sexuais ⁽³⁰⁾.

Ainda sobre este sítio, sabe-se que os subtipos mais associados são o HPV 16, 18, 31 e 33 ⁽⁸⁾. Porém, em relação a outros locais de cabeça e pescoço, a literatura demonstra que a prevalência de HPV é menor: meta-análise realizada com 146 estudos com cerca de 12.000 casos de CCE de cabeça e pescoço identificou uma prevalência dos vírus em orofaringe, cavidade oral e laringe de 46%, 24% e 22% respectivamente ⁽³¹⁾. Esta observação também pode ser feita no presente estudo, em que poucos casos HPV positivos estavam situados na cavidade oral.

Dos 7 casos nos quais foi detectada a superexpressão da proteína p16 através da técnica imunistoquímica, em apenas um foi evidenciada a presença do DNA-HPV, dado esse que não corrobora o que está descrito na literatura acerca da relação da alta prevalência do vírus em casos p16 positivos ⁽³²⁾. Porém, deve-se destacar que, das 6 amostras p16 positivas sem detecção de infecção, não foi possível recuperar o material

genético de duas, bem como as restantes eram provenientes de casos com histórico de tabagismo. Tais eventos justificam a ausência de detecção de DNA-HPV, uma vez que a falta de material genético impede a realização da técnica de PCR e o tabagismo tem sido estudado como uma causa de superexpressão da proteína p16. Em relação a exposição ao tabaco, acredita-se que, dependendo do tempo e dose de exposição, esse fator seria responsável pela metilação da proteína p16 e sua consequente superexpressão ⁽³²⁾.

Outro aspecto a se destacar sobre a pesquisa de HPV é que o processo de inclusão de amostras teciduais em parafina, apesar de oportunizar às unidades hospitalares o armazenamento das amostras a longo prazo e servir como uma fonte para estudos adicionais retrospectivos, envolve a utilização de formol, o qual, juntamente com o posterior processamento histológico, causa degradação e modificações químicas nas células, as quais podem interferir na qualidade e na viabilidade do DNA. Adicionalmente, algumas biópsias são extremamente pequenas e pode ser que a quantidade de material genético viral não tenha sido recuperada de forma suficiente para ser detectado pela técnica de PCR, apesar desta apresentar boa sensibilidade devido ao seu potencial de amplificação de um segmento específico de DNA do agente investigado. Sugere-se, portanto, que o aumento da amostragem e a melhoria nos protocolos de recuperação de DNA poderão gerar dados mais condizentes sobre a real prevalência de HPV nos casos de CCEs de cabeça e pescoço.

CONCLUSÃO

Apenas 7 casos apresentaram superexpressão da proteína p16, bem com 3 obtiveram detecção positiva para DNA-HPV. O grupo formado por ambos compartilha alguns aspectos em comum: pacientes mais jovens, tumor com estadiamento mais avançado e com lesões situadas principalmente em orofaringe, sítio em que há maiores evidências da carcinogênese associada ao HPV. Houve coexistência de proteína p16 e DNA-HPV em apenas um caso e superexpressão sem relação com tabagismo e com ausência de detecção DNA-HPV em dois. Esta última situação pode ser justificada pela falta de material genético para análise, que impediu a detecção do genoma viral.

Referências:

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, submitted.
2. Leite AA, Leonel ACL da S, Castro JFL de, Carvalho EJ de A, Vargas PA, Kowalski LP, et al. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. *Sao Paulo Med J Rev Paul Med*. abril de 2018;136(2):165–9.
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019.
4. Petito G, Carneiro MADS, Santos SH de R, Silva AMTC, Alencar R de C, Gontijo AP, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*. fevereiro de 2017;83(1):38–44.
5. Emerick C, Magalhães TG, Barki MCLJM, Crescencio1 LR, Tucci R, Barros EMVB, et al. Perfil sociodemográfico e clinicopatológico de 80 casos de carcinoma de células escamosas de boca. *J. Bras. Patol. Med. Lab*.2020;56(1):1-6
6. Sheedy T, Heaton C. HPV-associated oropharyngeal cancer. *JAAPA Off J Am Acad Physician Assist*. setembro de 2019;32(9):26–31.
7. O’Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 1º de abril de 2016;17(4):440–51.
8. I Haddad R. Epidemiology, staging, and clinical presentation of human papillomavirus-associated head and neck cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com>
9. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans. 2020.
10. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015;6(3):244–8.

11. de Abreu PM, Có ACG, Azevedo PL, do Valle IB, de Oliveira KG, Gouvea SA, et al. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 27 de março de 2018 [citado 4 de janeiro de 2021];18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5870524/>
12. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer*. 29 de fevereiro de 2012;7:4.
13. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. abril de 1995;76 (Pt 4):1057–62.
14. Villagómez-Ortíz VJ, Paz-Delgadillo DE, Marino-Martínez I, Ceseñas-Falcón LÁ, Sandoval-de la Fuente A, Reyes-Escobedo A. Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. *Cir Cir*. 1º de setembro de 2016;84(5):363–8.
15. van Monsjou HS, van Velthuysen MLF, van den Brekel MWM, Jordanova ES, Melief CJM, Balm AJM. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 15 de abril de 2012;130(8):1806–12.
16. Valls-Ontañón A, Hernández-Losa J, de Haro RSL, Bellosillo-Paricio B, y Cajal SR, Bescós-Atín C, et al. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Med Clínica Engl Ed*. 1º de março de 2019;152(5):174–80.
17. Alvarenga L de M, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli ÉC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo M. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Rev Bras Otorrinolaringol*. fevereiro de 2008;74(1):68–73.
18. Santos RA dos, Portugal FB, Felix JD, Santos PM de O dos, Siqueira MM de. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. *Rev Bras Cancerol*. 2012;21–9.
19. Wray A, McGuirt WF. Smokeless tobacco usage associated with oral carcinoma. Incidence, treatment, outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. setembro de 1993;119(9):929–33.

20. Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of Aerodigestive Tract Cancers. *Annu Rev Med.* 2002;53(1):223–43.
21. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.
22. Jehn P, Dittmann J, Zimmerer R, Stier R, Jehn M, Gellrich N-C, et al. Survival Rates According to Tumour Location in Patients With Surgically Treated Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* maio de 2019;39(5):2527–33.
23. Kowalski LP, Oliveira MM de, Lopez RVM, Silva DRM e, Ikeda MK, Curado MP, et al. Survival trends of patients with oral and oropharyngeal cancer treated at a cancer center in São Paulo, Brazil. *Clinics [Internet].* 2020 [citado 4 de janeiro de 2021];75. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1807-59322020000100226&lng=en&nrm=iso&tlng=em
24. Herchenhorn D, Dias FL. Avanços no tratamento quimioterápico e radioterápico do câncer de cabeça e pescoço. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2004;59:39-46.
25. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* janeiro de 2004;70(1):35–40.
26. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors, Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds), WHO Press, Lyon 2005.
27. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, et al. Human Papillomavirus and Overall Survival After Progression of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 23 de junho de 2014;32(30):3365–73.
28. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de fevereiro de 2006;24(5):736–47.
29. Sturgis EM, Ang KK. The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* 1º de junho de 2011;9(6):665–73.

30. Emmett S, Boros S, Whiteman DC, Porceddu SV, Panizza BJ, Antonsson A. Sexual behaviour, HPV status and p16INK4a expression in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinomas: a case–case comparison study. *J Gen Virol.* 2018;99(6):783–9.
31. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* novembro de 2014;15(12):1319–31.
32. Eduardo VM. Perfil da metilação e expressão do Gene CDKN2a em carcinoma epidermóide oral. Trabalho de Conclusão de Curso (Tese de Mestrado) Programa de pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória - Espírito Santo; 2018.